

**Volumetrische Untersuchungen zur BSP-Expression
humaner männlicher Osteoblasten auf Implantatoberflächen in-vitro
mittels Laser-Scanning-Mikroskopie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Kristin Bachmann

geboren am 18.05.1982 in Bad Frankenhausen

angefertigt am:

Friedrich-Louis-Hesse-Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und Orale
Medizin

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Leipzig AöR

Betreuer: Prof. Dr. med. dent. habil. H.-L. Graf

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 26.03.2013

Bibliografische Beschreibung

Bachmann, Kristin

Volumetrische Untersuchungen zur BSP-Expression humaner männlicher Osteoblasten auf Implantatoberflächen in-vitro mittels Laser-Scanning-Mikroskopie

Universität Leipzig, Dissertation

91 Seiten, 134 Abbildungen, 5 Tabellen, 99 Literaturzitate

Referat:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einsatz der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) für die Beurteilung von humanen Osteoblasten auf experimentellen Implantatoberflächen zu prüfen. Die acht Probekörper besaßen anodische Konversionsoberflächen, die aus den Elektrolyten Zirkoniumsulfat, Phosphorsäure und Kaliumfluorid sowie deren Kombinationen hergestellt waren. Als Positivstandard dienten TICER® und Cercon®, als Negativstandard commercial pure Titan (CPT/Reintitan). Diese Probekörper wurden in Chamber Slides mit einer humanen Osteoblastenkultur inkubiert. Am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag erfolgte die immunhistochemische Darstellung von Bone-Sialoprotein (BSP). Anschließend wurden im LSM fluoreszenzmikroskopisch 3D-Bildstapel aufgenommen und mit dem 2D-mikroskopischen Verfahren verglichen. Es zeigte sich, dass das Bone-Sialoprotein einen Hinweis auf aktive Osteoblasten darstellt. Die BSP-exprimierenden Strukturen, die sich zu Volumina zusammenfügen, variieren an den verschiedenen Versuchstagen und bei den unterschiedlichen Oberflächenstrukturen. Eine deutlich erhöhte BSP-Expressionsrate wurde bei den elektrolytisch beschichteten Probekörpern aus Zirkoniumsulfat, Kaliumfluorid und Phosphorsäure erfasst. Ein eindeutiger Unterschied zwischen der 2D-Mikroskopie und der LSM ergab sich jedoch nicht. Die LSM erlaubt aber zusätzlich Aussagen über absorbierte Proteine an den Probekörperoberflächen durch eine um 90°-gedrehte Projektion der 3D-Bildstapel.

INHALTSVERZEICHNIS

BIBLIOGRAFISCHE BESCHREIBUNG	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2. LITERATUR.....	6
2.1. Charakteristik des Bone-Sialoproteins (BSP).....	6
2.2. Titan als Grundmaterial	10
2.3. Zirkoniumdioxid	13
2.4. Anodische Konversionsoberflächen	16
2.4.1. TICER®	17
2.4.2. TiUnite®	19
3. MATERIAL UND METHODE.....	21
3.1. Material.....	21
3.1.1. Gewebeherkunft	21
3.1.2. Chemikalien und Lösungen	21
3.1.3. Verwendete Probekörper.....	24
3.2. Methode	31
3.2.1. Anzucht der Knochenzellen.....	31
3.2.2. Zellkultivierung.....	32
3.2.3. Versuchsvorbereitung.....	33
3.2.4. Markierung der Probekörper.....	33
3.2.5. Untersuchung der Probekörper mit dem Laser-Scanning-Mikroskop.....	34
3.2.6. Auswertung der 3D-Bildstapel	37
4. ERGEBNISSE	41
4.1. Laser-Scanning-Mikroskopie und Bestimmung der BSP-Expression	41
4.2. Grafische und visuelle Darstellung der BSP-Expression der Probekörper	42
4.2.1. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 1 – ZSE	43
4.2.2. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 2 – ZSG	47
4.2.3. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 3 – ZSG ½.....	51
4.2.4. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 4 – ZS4-0,5.....	55

4.2.5. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 5 – ZS4-2.....	59
4.2.6. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 6 – Cercon®	63
4.2.7. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 7 – TICER®	67
4.2.8. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 8 – CPT (Reintitan).....	71
4.2.9. Darstellung der Leerprobekörper 1-8 als 90°-Projektion	75
4.2.10. Zusammenfassung der Ergebnisse der BSP-Expressionen	77
5. DISKUSSION.....	81
ZUSAMMENFASSUNG	88
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
LITERATURVERZEICHNIS	XI
EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	XX

Abkürzungsverzeichnis

BIC	Bone-Implant-Contact
ANOF®	Anodische Oxidation unter Funkenentladung
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bone-Sialoprotein
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Kalziumdihydrogenphosphat
CPT	Commercial pure titan - kommerziell maschinenbearbeitetes Titan (Reintitan)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ELCER®	Elektrolyt-Ceramic
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 (basic)
FE	Funkenentladung
Gly	Glycin
kDa	Kilodalton
LP	Langpass
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-BSA	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 2 % BSA
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PK 1	Probekörper 1 → ZSE
PK 2	Probekörper 2 → ZSG
PK 3	Probekörper 3 → ZSG ½
PK 4	Probekörper 4 → ZS4-0,5
PK 5	Probekörper 5 → ZS4-2

PK 6	Probekörper 6 → Cercon®
PK 7	Probekörper 7 → TICER®
PK 8	Probekörper 8 → CPT
PMT	Photomultiplier
Ra	Endoberflächenrauigkeit
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Aminosäuresequenz aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure
TGF-β 1,2	Transforming Growth Factor
TICER®	Titan/Ceramic (keramisch beschichtetes Titan)
Y ₂ O ₃	Yttriumoxid
ZAM-Cy3	Cy3 (Indocarbocyanin)-konjugiertes Ziege-Anti-Maus

1. Einleitung und Zielstellung

Die Implantologie stellt in nahezu jeder Situation eine flexible und schonende therapeutische Option bei Zahnverlust dar. Sie hat sich zu einer Therapievariante entwickelt, die Kaukomfort und Ästhetik mit optimalen Mitteln rekonstruiert und einer funktionellen Restitutio ad integrum sehr nahe kommt. Implantatgetragener Zahnersatz vermittelt das Gefühl natürlicher Dentition. Der Zahnersatz sitzt fest und fügt sich harmonisch in die individuelle Zahnumgebung ein. Wegen der langfristigen Erfolgssicherheit bieten sich unterschiedliche Therapiemöglichkeiten. In der modernen Zahnheilkunde ist die Implantologie ein wichtiger Aspekt bei der Zahnersatzgestaltung.

Unter zahnärztlicher Implantologie versteht man das Einbringen von alloplastischem Material in den humanen Knochen, mit dem Ziel, die Voraussetzung für die ästhetische und funktionelle Rehabilitation zu verbessern und die physiologischen Involutionsprozesse (Knochenresorption, Funktionsreduktion) zu vermindern. Es entsteht ästhetischer und funktionell hochwertiger Zahnersatz in Form von Kronen, Brücken oder Prothesen, welcher durch Implantate getragen, gehalten oder gestützt werden kann.

Dabei müssen die Implantatmaterialien sehr hohen Anforderungen gerecht werden, um als solche eingesetzt werden zu können. Eine möglichst optimale Gewebeverträglichkeit, Unbedenklichkeit im Hinblick auf Allergien und eine der Kaukraft entsprechenden Belastbarkeit sollten ebenso, wie unbedingte Atoxizität und inertes Verhalten gegenüber der körperlichen Abwehr, unabdingbar sein. Nicht weniger wichtig sind Langlebigkeit, Entfernbarekeit und schadloses Verhalten gegenüber Nachbargewebe.

Um den Ansprüchen vom zahnärztlichen Behandler und Patient gerecht zu werden, ist auch eine schnelle Nutzbarkeit von Implantaten als Zahnersatz sehr bedeutsam. Es werden morphologische und chemische Variationen von Implantatoberflächen hergestellt. Obwohl hierbei die verschiedenen chemischen Oberflächen (Rauigkeit, chemische Zusammensetzung und Morphologie) der Implantate für die Osseointegration von Bedeutung sind, müssen

auch die Knochenqualität, Knochenquantität, Knochenoberfläche, die Implantatbelastung und die Insertionstechnik berücksichtigt werden (Misch, 1990).

Die Differenzen bei der Einheilung des Implantates und die Unterschiede in dem Knochen-Implantat-Interface (BIC) können durch eine Veränderung der Implantatoberfläche verursacht werden (Buser et al., 1998). Eine gezielte Veränderung der Implantatoberfläche hat somit einen spezifischen Einfluss auf die knochenbildenden Vorgänge. Durch Marx (Marx, 1994; Marx et al., 1998) konnte auch festgestellt werden, dass die im Wundbereich freigesetzten Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF2, TGF- β 1, 2) die Aktivität der Osteoblasten steigern.

Das Interesse der umfangreichen Forschung an Implantatoberflächen liegt primär in der Aufklärung des ultrastrukturellen Modus der Kontaktnahme zwischen Knochen und Fremdmaterial. Sekundär sollen daraus Möglichkeiten abgeleitet werden, die Art oder Kinetik der Kontaktnahme zu verbessern. Dies hat zusammen mit der Implantatform Auswirkungen auf die primäre und sekundäre Stabilität des Implantates im Knochen.

Die Stabilität des Implantates ist zeitlich unterschiedlich. Die *primäre Stabilität* beschreibt die intraoperativ erreichte Stabilität des Implantates infolge der Knochenqualität, der Knochenquantität und Implantatgeometrie als Grundvoraussetzung der Osseointegration (Meredith, 1998).

Die *Sekundärstabilität* wird bei allen Implantaten durch Hartgewebeanlagerung an der Implantatoberfläche in die vorhandenen Rauigkeiten bzw. Makrostrukturen (Einziehungen) oder das Durchwachsen von Fenestrationen erzielt (Koeck et al., 1996). Diese Bildung des neuen Knochens wird durch die Implantatoberflächenrauigkeiten modifiziert. Die entstehende Knochenmatrix kann sich mit den Retentionen auf der porösen Oberfläche des Implantates verzahnen, d. h. die osteogenetischen Zellen siedeln sich direkt auf der Implantatoberfläche an und formieren sich dort aus. Diese *Kontaktosteogenese* ist der günstigste Fall der Osseointegration. Dem gegenüber steht die *Distanzosteogenese*, bei der keine Knochenapposition an der Implantatoberfläche stattfindet. Der Kontakt zum Implantat wird mit der extrazellulären Matrix

hergestellt, welcher jedoch nicht formschlüssig ist (Davies, 1998). Die Abb. 1 zeigt diese beiden unterschiedlichen Osseointegrationswege.

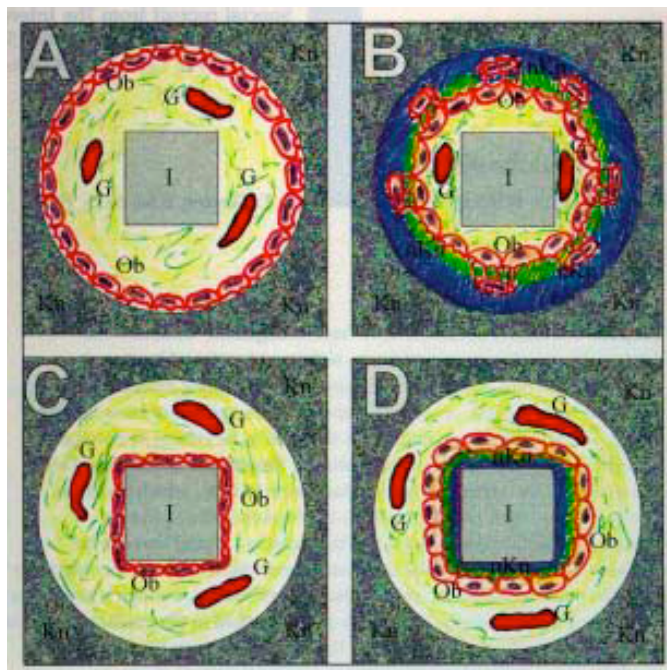


Abb. 1: Distanz- (A/B) und Kontaktosteogenese (C/D), (Davies, 1998)

In Abbildung 1 A säumen die Osteoblasten (=Ob) die Oberfläche des ortsständigen Knochens (=Kn), während in Abbildung C die Osteoblasten zunächst von der Implantatoberfläche (=I) rekrutiert werden. Die Blutversorgung (=G) dieser Zellen (=Ob) erfolgt in A von dem vaskularisierten Granulationsgewebe zwischen den Zellen und dem Implantat, in C jedoch von dem Granulationsgewebe zwischen den Osteoblasten und den vorhandenen Knochen. Abbildung B resultiert aus Abbildung A – Der neue Knochen (=nKn) wird auf der Oberfläche des vorhandenen Knochens (=Kn) gebildet. Abbildung D resultiert aus Abbildung C. Der neue Knochen wird direkt auf der Implantatoberfläche gebildet (de-novo Knochenbildung). In beiden Fällen (A/B, C/D) migrieren die Osteoblasten in die Richtung, aus der die Blutversorgung erfolgt (Davies, 1998).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die räumliche Verteilung des nicht-kollagenen Knochenproteins Bone-Sialoprotein (BSP) als Wachstumsfaktor bei acht möglichen Oberflächen von Implantaten mittels der konfokalen

Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) darzustellen, in der Annahme, dass sich Rückschlüsse auf die Untersuchungs- und Darstellungsmethode ergeben und sich ein Hinweis auf die zelluläre Konstellation zeigt. Dazu soll durch den fluoreszenzmarkierten Antikörper für BSP der Weißwert im Interface, also aus der 90°-Projektion, sowie die BSP-Expression im dreidimensionalen Bildstapel ermittelt werden. Es gilt zu beurteilen, ob die Untersuchung des Interface mit dem LSM durch die Ermittlung der dritten Dimension andere und genauere Ergebnisse erzielt, als die Untersuchung mittels einer zweidimensionalen-mikroskopischen Untersuchung.

Bei den acht verwendeten Probekörpern handelt es sich um CPT als Negativstandard, TICER® und Cercon® als Positivstandards sowie um sechs anodische Konversionsoberflächen, die aus den Elektrolyten Zirkoniumsulfat, Phosphorsäure und Kaliumfluorid, sowie deren Kombinationen, hergestellt waren, mit dem Grundkörper Titan. Das Zirkoniumdioxid Cercon® ist eine der zu vergleichenden Oberflächen, da in der dentalen Implantologie oft Diskussionen über den Erfolg oder Misserfolg bei der Insertion der Zirkoniumdioxid-implantate herrschen.

Es ist festzustellen, dass noch immer ein hoher Forschungsbedarf zur Klärung von Grundlagenmechanismen bei der Einheilung der Implantate besteht. In-vitro Untersuchungen können dazu beitragen, die auf das Implantat wirksamen Faktoren genauer zu analysieren. Störende Einflüsse, wie Speichel oder Kaudruck, wie sie bei in-vivo Untersuchungen vorkommen können, werden minimalisiert bis ausgeschaltet. Ob das Bone-Sialoprotein sich als Marker für humane Osteoblasten- und Osteozytenkulturen eignet, wurde durch Wiener (2003) untersucht.

Dieselben hier verwendeten Probekörper wurden auch schon durch Henning (Henning, 2011) und Buttchereit (Leipzig, 2012) gebraucht, um diese hinsichtlich der Knochenzellproliferation und Expression von BSP, Osteonectin, Osteocalcin und Wachstumsfaktor TGF- β mit dem 2D-Lichtmikroskop zu untersuchen.

Während der Methodenentwicklung sowie der Untersuchung der Probekörper mit dem Laser-Scanning-Mikroskop ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Zeigen die mit dem dreidimensionalen Laser-Scanning-Mikroskop detektierten BSP-Mengen Unterschiede zu den mittels zweidimensionaler Fluoreszenzmikroskopie gemessenen Werten?
 2. Was lässt sich aus den eventuell vorhandenen unterschiedlichen Ergebnissen bei diesen verschiedenen Verfahren schlussfolgern?
 3. Kann festgestellt werden, in welchem Bereich der einzelnen zu untersuchenden Zellen sich die BSP-Mineralisationsfront befindet? Ist die BSP-Expression dabei vor allem intrazellulär oder extrazellulär an der Implantatoberfläche eingelagert?
 4. Sind Unterschiede in der vertikalen Ausdehnung der BSP-Front auf den unterschiedlichen Probekörpern an den verschiedenen Versuchstagen auszumachen?
 5. Stellen sich Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den Implantatoberflächen in Bezug auf die BSP-positiven Strukturen dar?
 6. Welche Aussage über die BSP-Expression lässt sich an den verschiedenen Versuchstagen darstellen? Es ist zu prüfen, ob Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede festgestellt werden können.
-

2. Literatur

2.1. Charakteristik des Bone-Sialoproteins (BSP)

Zu den Geweben, in denen das Bone-Sialoprotein vorkommt, gehören das Dentin, der Schmelz und der Alveolarknochen (Abou-Samra et al., 1993).

Es handelt sich um ein säuerliches, phosphoryliertes, sialinsäurereiches, kalziumbindendes Protein, welches aus 19 % Glutamat und 15,4 % Aspartat besteht, die zu den sauren Aminosäuren gehören (Wuttke et al., 2001). Der hohe Anteil an Sialinsäuren von 12 % ist für die Namensgebung des Proteins ausschlaggebend. Das Protein ist glykosyliert und sulfatiert und hat die Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenz als Zell-Attachment (Butler, 1989). Diese RGD-Sequenz wird von Zelloberflächenrezeptoren, den Integrinen, erkannt und gebunden (vgl. Abb. 2). Integrine stellen Glykoproteine dar, welche inter- und intrazelluläre Wechselwirkungen kontrollieren. Somit ist es auch möglich, dass eine Zelladhäsion der Osteoblasten an Hydroxylapatit erfolgen kann (Oldberg et al., 1988). Bei in-vitro Untersuchungen konnte auch eine Stimulierung der Hydroxylapatitbildung dargestellt werden (Mansson et al., 1995).

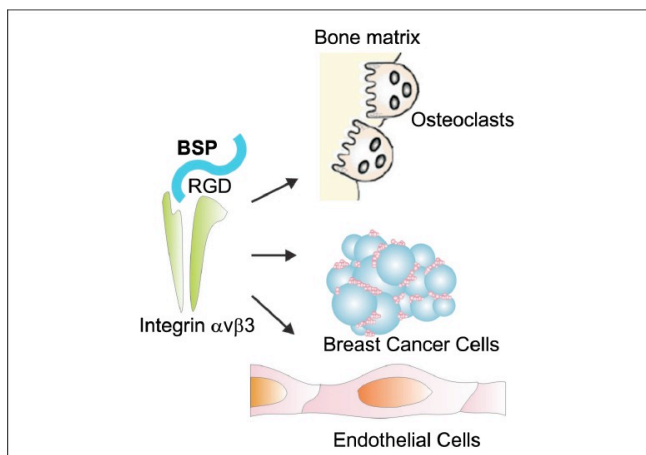


Abb. 2: Wechselwirkung des BSP mit Zellen

Integrin $\alpha v \beta 3$ und Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenz spielen eine wichtige Rolle, damit das Bone-Sialoprotein mit Endothelzellen, Osteoblasten und Tumorzellen in Wechselwirkung treten kann (Uccello et al., 2011).

Bone-Sialoprotein hat eine große Bedeutung in der de-novo Knochenbildung (Chen et al., 1992). Hieraus resultiert, dass BSP ein spezifischer Marker von Osteoblasten ist.

Das wichtigste Knochenprotein gehört zur Gruppe der nicht-kollagenen Proteine, die einen Anteil von 10 % an der organischen Matrix des Knochens ausmachen (Abou-Samra et al., 1993). Diese Gruppe an Proteinen im Knochen ist am Knochenzellwachstum, an der Differenzierung von Knochenzellen und an der Knochenzellaktivität beteiligt. Zusätzlich nimmt es Einfluss auf die Knochenmineralisation, auf das Zell-Recruitment und die Zell-Adhäsion.

Aus mineralisierter Knochenmatrix von Rindern (Fisher et al., 1983), Kaninchen (Kinne et al., 1987), Schweinen (Zhang et al., 1990) und aus sich entwickelnden humanen Knochen (Fisher et al., 1987) erfolgte die Isolierung des Bone-Sialoproteins. Zudem konnte die Aminosäuresequenz des BSP von einer Ratte bereits 1988 durch Oldberg et al. (Oldberg et al., 1988) erstellt werden, bevor 1990 durch Fisher et al. (Fisher et al., 1990) die des Menschen entschlüsselt werden konnte.

Die humane Sequenz besteht aus ca. 317 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 33-34 kDa. Nach Abspaltung der Signalsequenz (16 Aminosäuren) entspricht die Länge der Polypeptidkette von humanem BSP 301 Aminosäuren. In der Polypeptidkette können drei tyrosinreiche Regionen und zwei Bereiche, welche besonders reich an Glutaminsäure sind, festgestellt werden (Fisher et al., 1990). Dabei ist der C-Terminus des Proteins frei von Glykanen und verantwortlich für die teilweise globuläre Struktur des Proteins. Die hochglykolysierten Regionen sind auf Grund der Formation der Glykane in ihrer Struktur fadenähnlich und vermitteln kalziumbindende Eigenschaften (Oldberg et al., 1988) (vgl. Abb. 3).

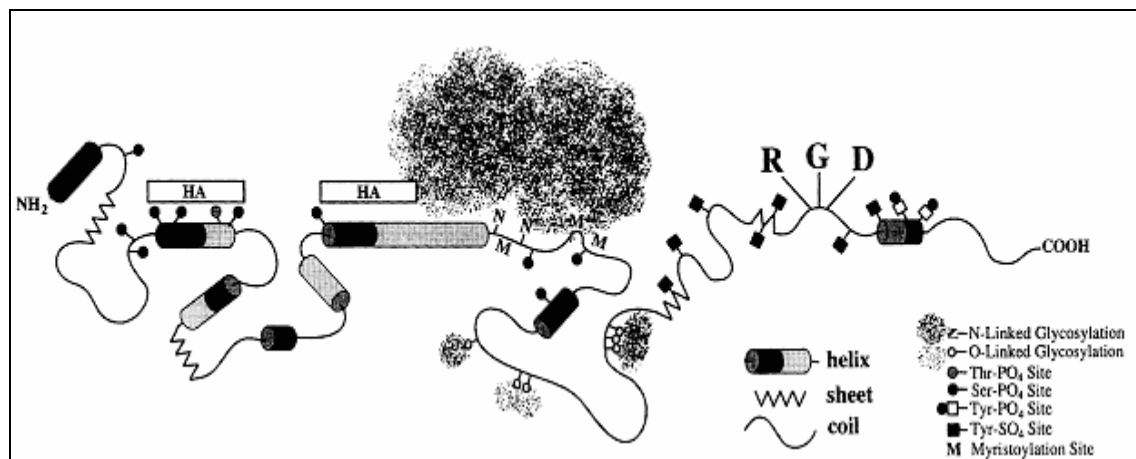


Abb. 3: Molekulare Struktur von BSP (Ganss et al., 1999)

Das Gen (vgl. Abb. 4) des Bone-Sialoproteins ist auf dem langen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert (Kerr et al., 1993; Kim et al., 1994).

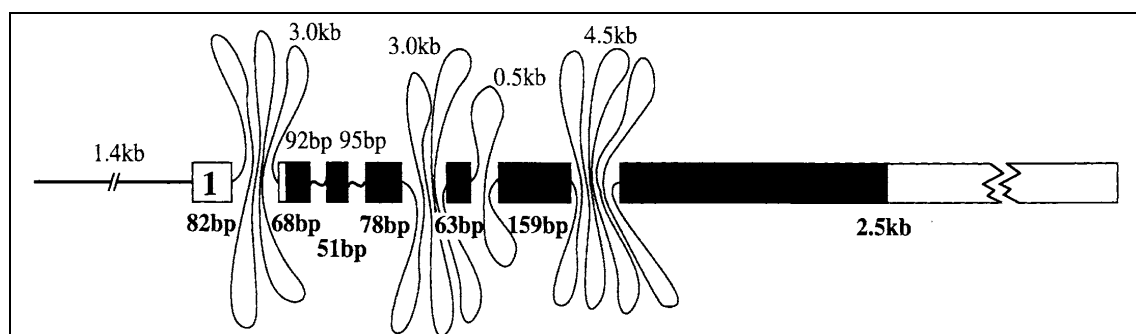


Abb. 4: Genstruktur von BSP (Ganss et al., 1999)

Multiple Interaktionen mit Kalzium beeinflussen die Proteinkonformation und können in Prozessen, welche kalziumvermittelt bzw. -abhängig sind, wichtig sein.

Das Bone-Sialoprotein wird durch die meisten Zelltypen des Knochens (Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten), des Knorpels (hypertrophe Chondrozyten) (Bianco et al., 1991), der Zementblasten (Bosshardt et al., 1998; Chen et al., 1992; Somerman et al., 1991; Sommer et al., 1996) und von reifen Ameloblasten, welche die Matrix des Zahnschmelzes synthetisieren (Chen et al., 1998), exprimiert. In der Knochenmatrix ist das BSP nicht gleichmäßig verteilt. Es konnte festgestellt werden, dass die höchsten Konzentrationen von BSP im mineralisierten Knochen in neu gebildeten und in remodellierten Arealen

gefunden werden. Es lagert sich an den sogenannten Zementlinien an, wo alter Knochen von Osteoklasten resorbiert und die neue Knochenmatrix von Osteozyten synthetisiert wird (Hultenby et al., 1994; Ingram et al., 1993). Osteoblasten, die sich in Teilung befinden, synthetisieren kein BSP. Für die Neusynthese von BSP sowie den Knochenumbau sind somit nur voll entwickelte Osteoblasten befähigt (Bianco et al., 1993).

Des Weiteren ist eine hohe Affinität des BSP zu Hydroxylapatit nachgewiesen worden. Bei in-vivo und in-vitro Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass BSP vor der Knochenmineralisierung (Arai et al., 1995; Chen et al., 1992; Roach, 1994) oder während dieses Vorganges (Cowles et al., 1998; Yao et al., 1994) nachweisbar ist, da es Kristallisationskeime für biologisches Apatit bildet. Die Transkriptionsrate von BSP steigt im Stadium der Mineralisation gleichzeitig mit der Kalziumeinlagerung und charakterisiert so das Stadium des reifen Osteoblasten (Groll et al., 2005). Extrazellulär ist BSP besonders dort lokalisiert, wo eine Mineralisation vonstattengeht (Ganss et al., 1999).

2.2. Titan als Grundmaterial

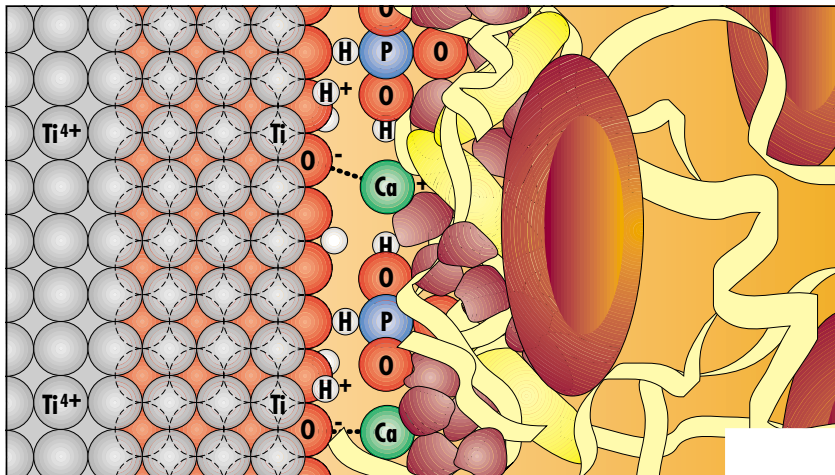
Reintitan ist derzeit das am häufigsten in der zahnärztlichen Implantologie benutzte Material. Dieser Werkstoff wurde umfangreich untersucht und hat sich im Hochtechnologiebereich bewährt (Adell et al., 1990; Brånemark et al., 1969). Zu den qualitativ optimalen Faktoren, die das Material unabdingbar machen, zählen die Biokompatibilität und die mechanische Festigkeit. Das Reintitan ist in vier Grades verfügbar, wobei der Eisen- und Sauerstoffanteil (nach DIN 17850 / ASTM F67) sowie die Zugfestigkeit je mm^2 und Vickershärte mit Höhe des Grades zunimmt (vgl. Tab. 1). Ti-6Al-4V charakterisiert dabei eine Titanlegierung aus Aluminium und Vanadium mit dem Grade 5. Je höher sich der Grade darstellt, desto geringer ist die Bruchdehnung, was die geringere Steifigkeit gegenüber Stahl zeigt. Diese somit höhere Elastizität des Titanimplantates ist Voraussetzung für die Anpassung an den Knochen (Wintermantel et al., 1998).

Tab. 1: Mechanische Eigenschaften von Titan
Zusammensetzung von Reintitan nach DIN 17850 / ASTM F67 und Ti-6Al-4V nach DIN 17851 und ASTM F136 (Stock et al., 2003)

	Fe max.	C max.	N max.	O max.	H max.	Al max.	V max.	Zug- festigkeit (N/mm ²)	Bruch- dehnung (%)	Vickers- härte (HV)	E- Modul (GPa)
Grade 1	0,20	0,08	0,05	0,12	0,01	-	-	350	45	120	110
Grade 2	0,25	0,08	0,05	0,18	0,01	-	-	470	35	150	110
Grade 3	0,30	0,10	0,05	0,25	0,01	-	-	560	25	170	110
Grade 4	0,35	0,10	0,05	0,35	0,01	-	-	640	25	200	110
Ti-6Al-4V	<0,25	<0,08	<0,05	<0,13	<0,01-2	5,5-6,5	3,5-4,5	800-1000	10	320	95

Bei Reaktion der Titanoberfläche mit dem Sauerstoff der Umgebung, z. B. im Wasser oder in elektrolytischer Lösung, bildet sich in Nanosekunden eine Oxidschicht. Nach einer Minute hat diese Oxidschicht bereits eine Dicke von 10 nm (Graf et al., 2004). Das entstandene Titandioxid ist chemisch stabil, weist eine geringe Anzahl von geladenen Teilchen auf, ist in fast allen Medien sehr gering löslich und zeigt keine Zytotoxizitäten und Gentoxizitäten. Eine Folge der guten

Reaktionsfähigkeit der Titanoxidschicht ist die hohe Biokompatibilität. Wenn die Titanoxidoberfläche mit Blut in Berührung kommt, bilden sich titanphosphat- und kalziumhaltige Hydroxylgruppen, es entsteht also Kalziumphosphatapatit (Worthington et al., 1995).



**Titan Oxidschicht Adsorbierte Kalzium- und Phosphationen,
Biomoleküle, Fibrinnetzwerk und Osteoblasten**

Abb. 5: Anlagerung der Osteoblasten an die Implantatoberfläche (Stock et al., 2003)

Die Interaktion mit den Biomolekülen im Organismus ist für die Osseointegration der Implantate von großer Bedeutung. Somit haben die Osteoblasten die Möglichkeit, sich an der Implantatoberfläche anzuheften (Gehrke, 2008; Stock et al., 2003). Abbildung 5 zeigt grafisch die Anlagerung der Osteoblasten an die Titanimplantatoberfläche mit Ausbildung der Kalziumphosphatkomplexe über Bindungsstellen der an die Implantatoberfläche angelagerten Proteine. Darausfolgend können sich zu einem späteren Zeitpunkt Kollagenfasern in diesen Komplex einlagern. Bei glatten Implantatoberflächen sind die angelagerten Biomoleküle flach und bei strukturierten Oberflächen als Netzwerk aufgebaut (Davies, 1998).

Woodman et al. konnten 1984 in einem in-vivo Versuch feststellen, dass in einem Interface-Abstand von 600 µm die Titankonzentration abnimmt (Woodman et al., 1984).

Auf Grund der freigesetzten Titanpartikel können die mesenchymalen Stammzellen in ihrer Differenzierung gehemmt werden. Die Apoptoseinduktion wird in Abhängigkeit von der Dosis und Dauer der Einwirkung der Tumorsuppres-

sorgene p53 und p73 auf die Zellen hervorgerufen. Ebenso wird durch den direkten Kontakt der humanen Zellen mit CPT die BSP-Expression reduziert, die extrazelluläre Mineralisation gehemmt und die Zell- und Proliferationsrate der Osteoklasten vermindert (Wang et al., 2003).

Neben den implantatmedizinisch, biologisch positiven Eigenschaften des Titans treten jedoch ungewollte Effekte auf. So ist die graue Farbe des Titanimplantates als problematisch zu bewerten. Dünnes periimplantäres Weichgewebe in ästhetisch relevanten Regionen kann zu unschönen Beeinträchtigungen führen, indem die graue Farbe sichtbar wird (Heydecke et al., 1999; Tan et al., 2004; Wohlwend et al., 1996). Weil auch immer häufiger allergische Reaktionen gegenüber Metallen auftreten und somit zu einer kritischen Haltung zu Titan führen, ist bei Patienten und bei Zahnmedizinern die Nachfrage nach zahnfarbenen Implantatmaterialien existent (Meyer, 2002).

Eine Übersicht und Zusammenfassung über die physikalischen und chemischen Eigenschaften von reinem Titan zeigt die nachfolgende Tabelle 2.

Tab. 2: Physikalische und chemische Eigenschaften von reinem Titan nach DIN 17850 / ASTM F67

Titan	
Symbol	Ti
Ordnungszahl im Periodensystem	22
Atommasse	47,867 u
Dichte	4,505 g/cm ³
Zugfestigkeit	350 MPa
Elastizitätsmodul	108 N/mm ² * 10 ³
Schmelzpunkt	1670°C
Siedepunkt	3287°C
elektrischer Widerstand	0,47 Ω*mm ² /m
Bruchdehnung	24-30 %
Wärmeleitfähigkeit	22 W/(m*K)
Härte nach Vickers	80-120
Wärmeausdehnungskoeffizient	8,6 * 10 ⁻⁶ 1/K

2.3. Zirkoniumdioxid

Obwohl sich Titan als zuverlässiger Werkstoff in der Implantologie bewährt hat, ist der Wunsch bei Zahnmedizern und dessen Patient nach anderen biokompatiblen Werkstoffen vorhanden.

Zirkoniumdioxid (ZrO_2) hat sich als inertes, biokompatibles, anorganisches, nicht-metallisches und nicht-resorbierbares Material erwiesen (Piconi et al., 1999). Es wurde erstmals 1789 vom deutschen Chemiker Klaproth durch Erhitzen von Zirkoniumsteinen hergestellt. Der Hauptrohstoff zur Gewinnung von Zirkoniumdioxid ist das Mineral Zirkon.

Zirkoniumdioxid kann in drei unterschiedlichen Formen existieren. Bei Raumtemperatur liegt es in der monoklinen Phase vor, wobei die Dichte $5,8 \text{ g/cm}^3$ beträgt. Diese Phase ist bis 1170°C stabil. Steigt die Temperatur weiter, geht diese Phase in die tetragonale Phase über. Die Dichte erhöht sich nun auf $6,1 \text{ g/cm}^3$, was eine Volumenabnahme um 3-4 % bedeutet. Ab 2370°C liegt die kubische Phase vor. Durch die Volumenzunahme bei dem Übergang von der tetragonalen Phase (höhere Temperatur) in die monokline Phase (niedrigere Temperatur) kommt es bei reinem Zirkoniumdioxid zu Rissen, was erklärt, dass bei Temperaturabnahme das Material zerstört wird (Garvie et al., 1975; Piconi et al., 1999). Bei Zugabe von metallischen Oxiden, wie Magnesiumoxid (MgO), Yttriumoxid (Y_2O_3) oder Kalziumoxid (CaO), lässt sich das Zirkoniumdioxid, durch Bildung von Mischkristallen in der tetragonalen Struktur stabilisieren (Chevalier, 2006; Piconi et al., 1999).

Auf Grund dieser Polymorphie ist Zirkon in der Lage, entstandene Risse in ihrer Ausbreitung zu verhindern (vgl. Abb. 6). Die Energie, die durch die Mikrorisse frei wird, wird abgelenkt und adsorbiert. Es werden Druckspannungen durch die Volumenzunahme aufgebaut, die der Ausbreitung des Risses entgegenwirken. Daraus folgt für die Keramik eine sehr hohe Zug-, Biege- und Rissfestigkeit (Garvie et al., 1975).

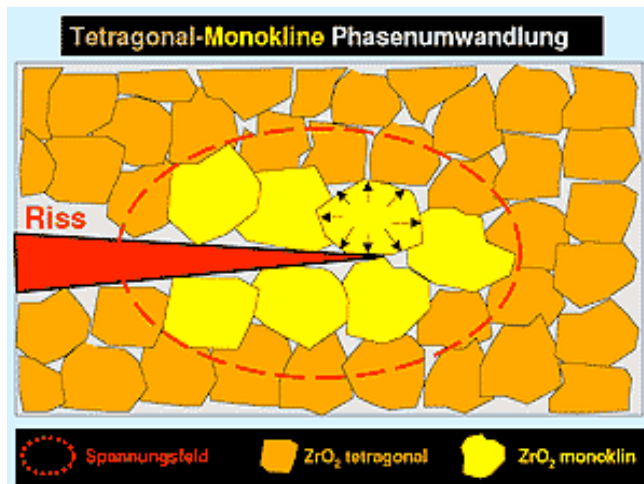


Abb. 6: Phasenumwandlung innerhalb der Keramik bei Spannungsaufbau (alkomdigital-S.à.r.l., 2002)

Zirkonumdioxid als Metallersatz weist optimale physikalische Eigenschaften auf: Eine hohe Biegefestigkeit (900-1200 MPa), eine Härte von 1200 Vickers und einen hohen Weibull-Modul von 10 bis 12, welcher das Streuverhalten der Festigkeit durch den Vierpunktbiegeversuch charakterisiert. Je höher der Faktor des Weibull-Moduls ist, umso homogener ist der untersuchte Werkstoff. Des Weiteren konnte bei Zirkonumdioxid experimentell ein geringes Korrosionspotential dokumentiert werden (Marx, 1993; Piconi et al., 1998; Stevens, 1986). Durch den Zusatz verschiedener Metalloxide zu Zirkon (Yttriumoxid, Kalziumoxid oder Magnesiumoxid) werden unterschiedliche Anwendungsbereiche abgedeckt. Für die Zahnmedizin ist das Yttriumoxid [Y-TZP (yttrium stabilized tetragonal zirconia polycrystals)] von Bedeutung, da hier das dichteste, feinkörnigste und mechanisch hochwertigste Gefüge entsteht. Bei in-vivo Versuchen wurden sehr gute Gewebeverträglichkeiten festgestellt (Ichikawa et al., 1992). Y-TZP gilt sowohl für Osseointegrationsvorgänge als sehr sensibel, sowie auch für die Knochenneubildung an aufgerauten Oberflächenstrukturen (Dubruille et al., 1999; Gahlert et al., 2007; Hoffmann et al., 2008).

Bei dem Werkstoff Zirkonumdioxid liegt eine hydrophobe Oberfläche mit hydrophoben Wechselwirkungen vor. Durch diese Wechselwirkungen konnte von Rezwan et al. (2005) eine hohe Absorption von negativ geladenem Serumalbumin und positiv geladenem Lysozym an die Zirkonumdioxidober-

fläche beschrieben werden. Die absorbierten Proteine ändern die elektrischen Potentiale der Oxidoberfläche. Bei Titan ist die Proteinabsorption vor allem von den elektrostatischen Kräften abhängig.

Wie in Untersuchungen von Ferraris et al. (2000) bestätigt, sind keine toxischen Effekte zu erwarten, wenn Zirkoniumdioxid mit Knochen oder Weichgewebe in Kontakt kommt. Des Weiteren ist eine deutlich reduzierte Anhaftung von Plaque auf der Oberfläche von Zirkoniumdioxid, gegenüber Titan (vgl. Abb. 7 und Abb. 8), bei vergleichbaren Oberflächenrauigkeitswerten, festgestellt worden. Das Maß der Plaqueanhaftung ist also unter anderem von der Oberflächenrauigkeit abhängig (Quirynen et al., 1996; Rimondini et al., 2002).

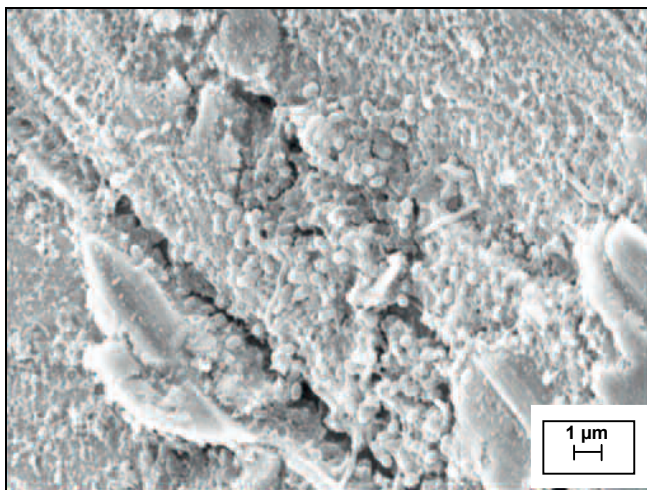


Abb. 7: Bakterienanhaftung an Titan (Gehrke, 2008)

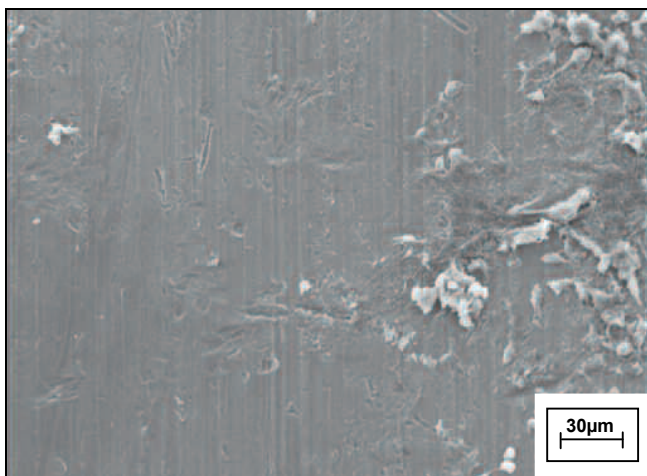


Abb. 8: Bakterienanhaftung an Zirkoniumdioxid (Gehrke, 2008)

2.4. Anodische Konversionsoberflächen

Krysmann beschrieb 1982 ein grundlegendes Verfahren, um eine elektrochemisch konditionierte Implantatoberfläche herzustellen. Das Verfahren wurde von ihm als „Anodische Oxidation unter Funkenentladung“ (ANOF®) formuliert (Krysmann, 1982).

Bei diesem Verfahren wird dem Implantatgrundkörper aus Titan unter Plasmabedingungen eine Oxidschicht erschmolzen (Graf et al., 1986). Das zu beschichtende Implantat wird bei dem elektrolytischen Vorgehen als Anode und die Titanelektrode als Kathode angesehen. Als elektrolytischer Leiter wird eine Kalziumdihydrogenphosphatlösung verwendet. Beim Anlegen einer Spannung entsteht zunächst eine Sperrschicht auf der Implantatoberfläche. Wird die Spannung erhöht, bildet sich ein Gasfilm auf der Metalloxidoberfläche aus und dann die Oxidschicht auf der Seite der Anode. Bei weiterem Spannungsanstieg entwickelt sich an energetisch günstigen Stellen ein Entladungskanal, welcher als Richtungsweisung für die Funkenentladung gilt. Durch die steigende Spannung wird auf der Implantatoberfläche ein Funkenschlag induziert. Somit werden die Rauigkeiten auf der Oberfläche des Grundmaterials und in der Oxidschicht hervorgerufen (Graf, 1997). Durch den Funkenschlag wird die Implantatoberfläche aufgeschmolzen, oxidiert und es werden 40 % Kalziumphosphate an der Grenzfläche eingelagert. Die komplette Implantatoberfläche wird mit dem Strukturoxid überzogen, indem die energetisch günstigeren Nachbarbereiche der Funkenentladung ebenfalls aktiviert werden (Graf et al., 2004). Die mikrostrukturierte Titanoxid-Kalziumphosphat-Oberfläche hat eine Dicke von 20-30 µm (Graf et al., 2001).

2.4.1. TIGER®

Die zuvor beschriebene Technologie der ANOF® wurde durch Graf et al. verwendet, um enossale Implantate zu beschichten. Diese Oberflächen wurden seit 1985 unter der Bezeichnung ELCER® (Elektrolyt-Ceramic) auf das Implantatsystem der Firma MLE Medizintechnik Suhl und in der Weiterentwicklung als TIGER® (Titan-Ceramic) auf das ZL-Duraplast® Implantatsystem angewendet.

2004 haben Graf et al. die Implantatoberflächen aus ELCER®, TIGER® und TiUnite® rasterelektronenmikroskopisch und rasterelektronenstrahl-mikroanalytisch untersucht. Sie konnten eine Ähnlichkeit in der Oberflächenstrukturierung feststellen. Der Unterschied besteht in der Zusammensetzung der Elemente der Oberfläche. Die TIGER®-Oberfläche enthält neben Titan, Sauerstoff und Phosphor auch Kalzium. Bei der TiUnite®-Oberfläche konnte kein Kalzium festgestellt werden (Graf et al., 2004).

Die TIGER®-Oberfläche zeigt eine im Mikrometerbereich liegende Topographie und Struktur, wobei das eingeschmolzene Oxid sowie die miteinander verbundene schwammige Oberflächenstruktur erkennbar sind (vgl. Abb. 9).

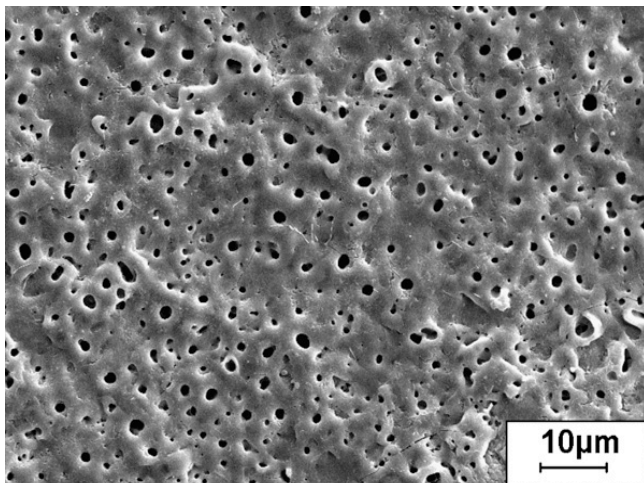


Abb. 9: REM-Aufnahme der Implantatoberfläche TIGER® (Graf et al., 2008)

Durch die Elektrolyse mit einem Kalziumdihydrogenphosphat-Elektrolyt der Titanoberfläche entsteht eine bis 10 µm dicke poröse Oberflächenschicht mit

einem Porendurchmesser von 1-5 μm . Diese Oberflächenstruktur, mit einem hohen Anteil an Kalzium und Phosphat, ist für die Anlagerung von Wachstumsfaktoren oder Knochenproteinen von Bedeutung. Während der anodischen Funkenentladung der Titanoberfläche bildet sich eine Titanoxidschicht, die bei Spannungserhöhung noch vergrößert und modifiziert werden kann. Die Oxidschicht ist für den hohen Korrosionswiderstand der anodisch-oxidierten Oberfläche entscheidend.

Diese Art der Oberflächenerzeugung und -zusammensetzung des Titan ist bezüglich des Abriebwiderstandes, Korrosionswiderstandes und der biokompatiblen Zusammensetzung der Implantatoberflächenstrukturen von hohem Interesse (Schreckenbach et al., 1999).

2.4.2. TiUnite®

Die TiUnite®-Oberfläche wurde im Jahr 2000 durch die Firma Nobel Biocare® (Schweden) in den Markt eingeführt, welche eigentlich Hersteller der glatten Branemark®-Implantate waren. Die Herstellungsweise wurde ebenfalls als „Anodische Oxidation“ bezeichnet (Hall et al., 2000). Dabei wird durch die Anodisierung bei der Funkenentladung, diese Implantatoberfläche aus Titanoxid hergestellt, welche sich porös und mäßig rau mit einer Ra von $\sim 1,3 \mu\text{m}$ darstellt (Kurze et al., 1984; Neupert et al., 1986). TiUnite® weist eine Mikrostruktur ohne scharfe Kanten auf (Abb. 10).

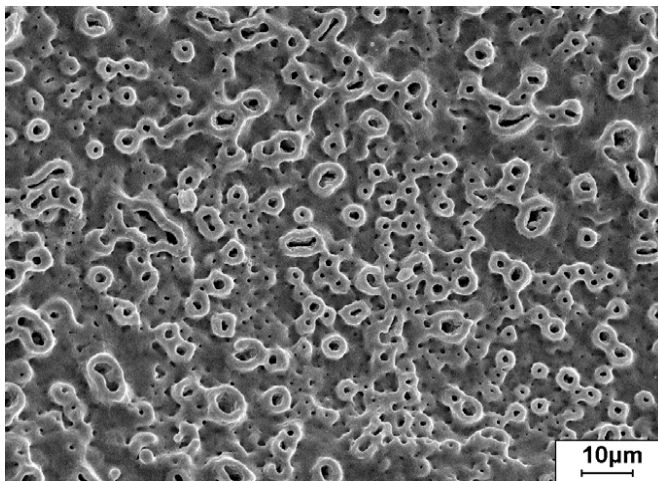


Abb. 10: REM-Aufnahme der Oberfläche TiUnite® (Graf et al., 2009)

Die Oberfläche zeichnet sich durch gleichmäßig verteilte, offene Poren im niedrigen Mikrometerbereich aus, ist mit Phosphat angereichert und hoch kristallin. Auf Grund der nicht-maschinieren Oberfläche ist ein rasches Knochenwachstum festzustellen, welches somit die Osseointegration des Titanimplantates beschleunigt (Albrektsson et al., 2000; Gottlow et al., 2000) und mit einer höheren Geschwindigkeit verläuft als bei maschinenbearbeiteten Oberflächen. Eine bessere Vorhersagbarkeit in der Osseointegration der Implantate ist damit möglich (Glauser et al., 2003).

Durch Xiropaidis et al. (2005) wurde nachgewiesen, dass die osseokonduktiven Eigenschaften von TiUnite® denen von Kalziumphosphat-Implantatoberflächen

entsprechen. Der Vorteil der TiUnite®-Oberfläche liegt in dem signifikant geringeren periimplantären Knochenverlust, wie es durch Watzak et al. (2006) aufgezeigt wurde. 2001 konnte durch Glauser et al. (Glauser et al., 2001) nachgewiesen werden, dass bei TiUnite® auch während der kritischen Einheilphase die mechanische Stabilität auf einem hohen Niveau bleibt. Diese Oberfläche wurde aber außerdem noch 2007 von Schupbach (Schupbach et al., 2007) als Material beschrieben, welches das Anwachsen von Weichgewebe an die Implantatoberfläche ermöglicht. Es weist funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten mit der Gingiva um natürliche humane Zähne auf.

3. Material und Methode

3.1. Material

3.1.1. Gewebeherkunft

Nach Genehmigung der Ethikkommission der Universität Leipzig und vorheriger schriftlicher Einverständniserklärung des Spenders, wurde nach Desinfektion des Mundes im Rahmen eines oralchirurgischen Eingriffes in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig abgefallenes Knochengewebe aus dem Unterkiefer des Patienten zur Anzüchtung von Primärkulturen aufbewahrt und in sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit Antibiotika gegeben.

3.1.2. Chemikalien und Lösungen

Chemikalien

Produkt	Hersteller
• Paraformaldehyd	<i>Merck</i>
• Rinderserumalbumin, Fraktion 5 (BSA)	<i>SIGMA</i>
• Kollagenase-Typ IV, Konzentration: 166 U/mg	<i>Biochrom AG</i>
• Ethanol absolut	<i>J.T. Baker</i>
• Trypsin 0,5 % in PBS, mit EDTA	<i>PromoCell bioscience alive</i>
• Penicillin / Streptomycin / Fungizone (10.000 IU/ml, 250 µm/ml Fungizone)	
• Aqua dest.	<i>Apotheke Universitätsklinikum Leipzig</i>
• Ziegen-Normalserum	<i>DAKO CORPORATION</i>
• Fluoreszent Mounting Medium	
• 4,6-Diamidino-2-phenylindol, 2HCl p.A. (DAPI)	<i>SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. KG</i>

Puffer

Produkt		Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH = 7,4 		<i>Apotheke Universitätsklinikum Leipzig</i>
- Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.a.	1,463 g	
- Kaliumdihydrogenphosphat p.a	0,245 g	
- Natriumchlorid DAB 10	8,0 g	
- Aqua dest.	ad 1000 ml	

Nährmedium

Produkt	Hersteller
<ul style="list-style-type: none">• Osteoblast Growth Medium	<i>PromoCell bioscience alive</i>
- Supplement Mix/Osteoblast Growth Medium	
- Fetal Calf Serum 10 %	

Antikörper

Produkt		Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> <u>Primärantikörper</u> Anti-human-Bone-Sialoprotein-Antikörper (monoklonal) der Maus 		<i>Immundiagnostik AG</i>
<ul style="list-style-type: none"> <u>Sekundärantikörper</u> Cy™ 3-konjugiertes Ziegen Anti-Maus IgG (H+L) 		<i>JacksonImmuno Research Laboratories, INC.</i>

Labortechnisches Zubehör

Produkt		Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Sicherheitswerkbank Herasafe 		<i>Kendro Laboratory Products</i>
<ul style="list-style-type: none"> Brutschrank Thermo Forma 		<i>Thermo Electron Corporation</i>

• Zentrifuge Eppendorf 5702	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz</i>
• Analysenwaage Kern 410	<i>Kern & Sohn</i>
• Neubauer Zählkammer	<i>Feinoptik – Bad Blankenburg</i>
• Schüttler VIPRAMAX 100	<i>Heidolph</i>
• Vortex-Mixer	<i>Stuart</i>
• Kühlschrank + Tiefkühlschrank (-20°C)	<i>Liebherr</i>
• Wasserbad	<i>GFL</i>
• Zellkulturflaschen mit Filter Top - kontaminationssicherer Verschluss; 25 cm ² und 75 cm ²	<i>Greiner bio one</i>
• Pipettierhilfe Accu-Jet	<i>Brandt</i>
• Eppendorf Research Pipetten (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	<i>Eppendorf AG</i>
• Spritzen für Eppendorfpipetten	
• Serologische Einmalpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml)	<i>SARSTEDT</i>
• Einmalspritzen Omnilix	<i>B.Braun Melsungen AG</i>
• Lab-Tec® II Chamber Slide™ System	<i>Nalge Nunc International</i>
• Eppendorf Reaktionsgefäße (2 ml)	<i>Eppendorf AG</i>
• Deckgläser	<i>Menzel Gläser</i>
• Zentrifugenröhrchen (15 ml)	<i>Greiner bio one</i>
• Skalpell	<i>Aesculap</i>

Geräte zur Auswertung

Produkt	Hersteller
• Mikroskop Axiovert 25 C	<i>Carl Zeiss Jena</i>
• Software – Laser-Scanning-Mikroskop 5 PASCAL	
• Tabellenkalkulationsprogramm Excel	<i>Microsoft</i>
• ImageJ 1.40g	<i>National Institutes of Health</i>

3.1.3. Verwendete Probekörper

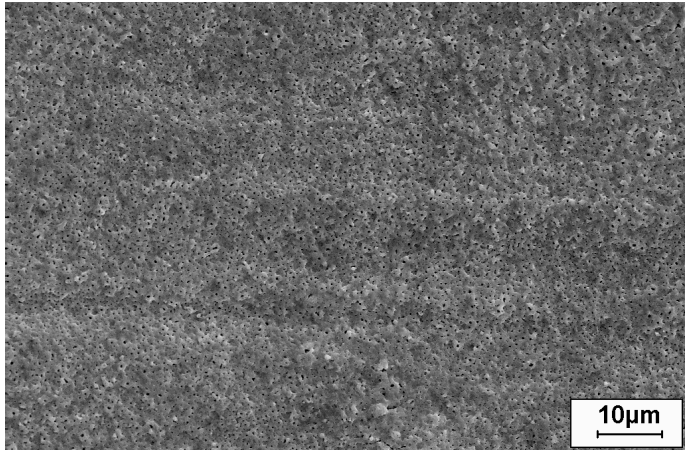
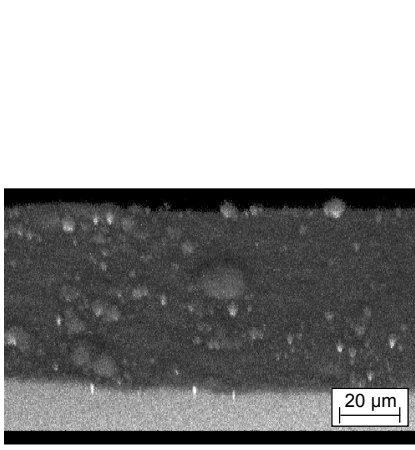
Die für den Versuch verwendeten Probekörper haben einen Durchmesser von 6 mm und eine Dicke von 0,5 mm.

Im Versuch werden acht Probekörper untersucht. Als Grundkörper der Probekörper 1 bis 5 und 7 wird Reintitan (CPT) gebraucht, welches mit verschiedenen Elektrolyten galvanisiert wurde. Als Probekörper 6 wird Cercon® und als Probekörper 8 CPT verwendet.

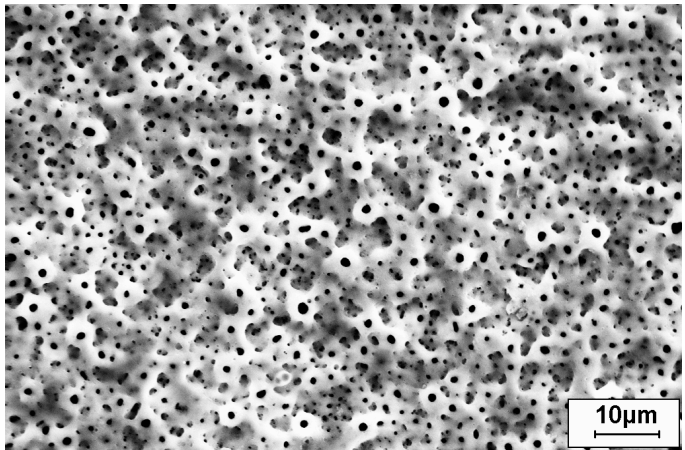
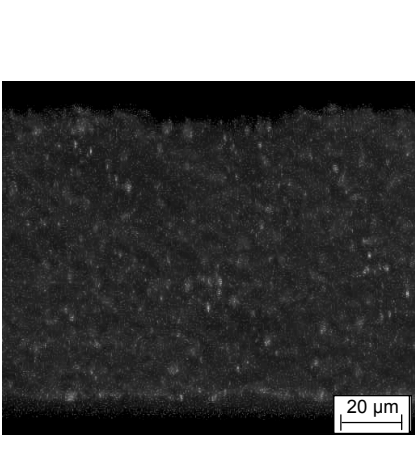
Probekörper	Bezeichnung
Probekörper 1	ZSE
Probekörper 2	ZSG
Probekörper 3	ZSG ½
Probekörper 4	ZS 4-0,5
Probekörper 5	ZS 4-2
Probekörper 6	Cercon® (Positivstandard)
Probekörper 7	TICER® (Positivstandard)
Probekörper 8	CPT – kommerziell maschinen- bearbeitetes Reintitan (Negativstandard)

Die acht verwendeten Probekörper werden im Folgenden charakterisiert. Es wird die rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen (LSM) Aufnahme gegenübergestellt. Die Zusammensetzung der Elektrolytlösung und die visuelle Beschreibung der Oberfläche werden dabei formuliert.

3.1.3.1. Probekörper 1 – ZSE

	
Abb. 11: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZSE	Abb. 12: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZSE – leicht gedreht; ohne Zellen
Elektrolyt [c/l] :	1 l 0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat + 0,3 l 15 % KF Lsg.-ZSE
Bemerkungen :	hellgraue, dünne homogene Schicht

3.1.3.2. Probekörper 2 – ZSG

	
Abb. 13: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG	Abb. 14: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG – leicht gedreht; ohne Zellen
Elektrolyt [c/l] :	1 l 0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat + 0,3 l 15 % KF Lsg.- (ZSE Imp) + 0,015 l konz. Phosphorsäure – ZSG
Bemerkungen :	hellgraue Schicht, gute FE

3.1.3.3. Probekörper 3 – ZSG ½

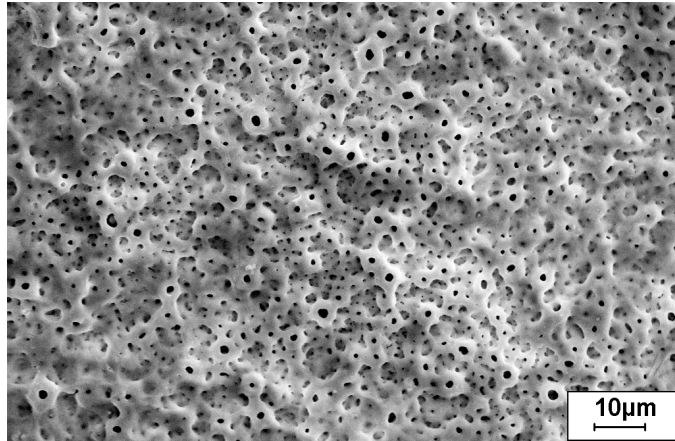


Abb. 15: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG ½

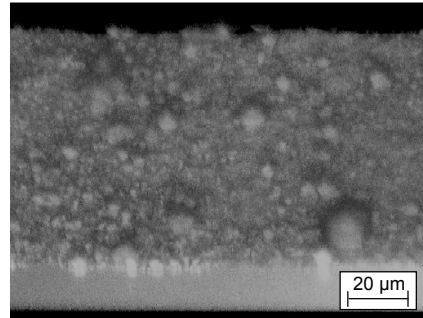


Abb. 16: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG ½ – leicht gedreht; ohne Zellen

Elektrolyt [c/l] :	1 l 0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat + 0,3 l 15 % KF Lsg.- (ZSE Imp) + 0,015 l konz. Phosphorsäure – (ZSG) + Wasser 1:1 – ZSG ½
Bemerkungen :	dunkelgraue Schicht

3.1.3.4. Probekörper 4 – ZS4-0,5

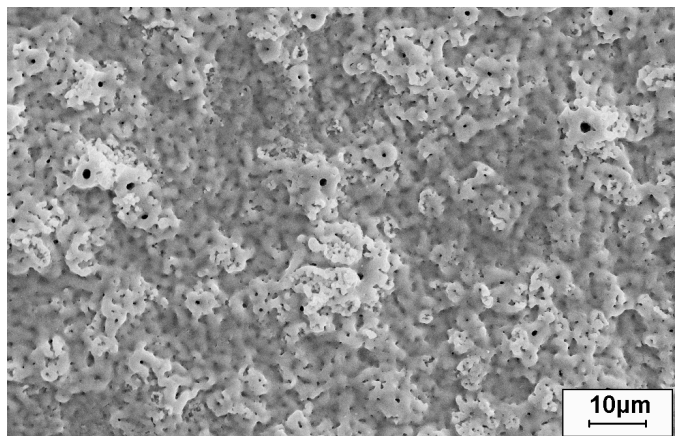


Abb. 17: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-0,5

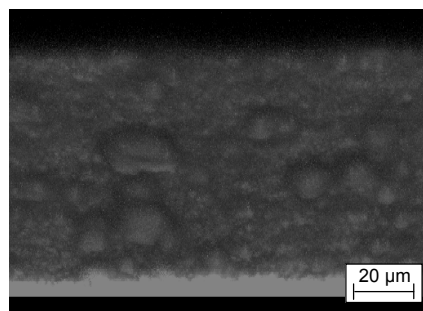


Abb. 18: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-0,5 – leicht gedreht; ohne Zellen

Elektrolyt [c/l] :	22 g/l Zirkonium(IV)-sulfat
Bemerkungen :	homogene graue Schicht

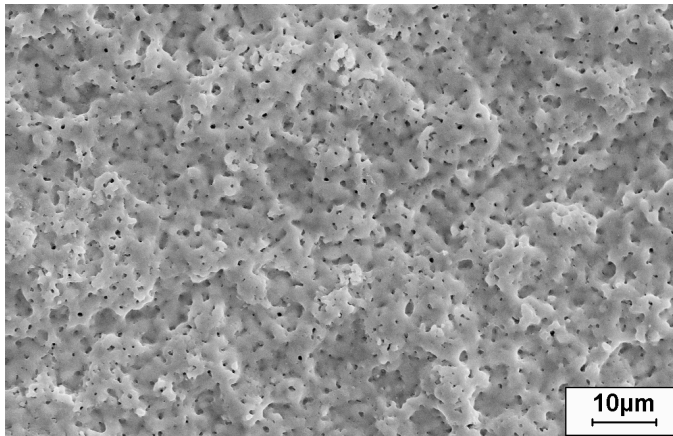
3.1.3.5. Probekörper 5 – ZS4-2

Abb. 19: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-2

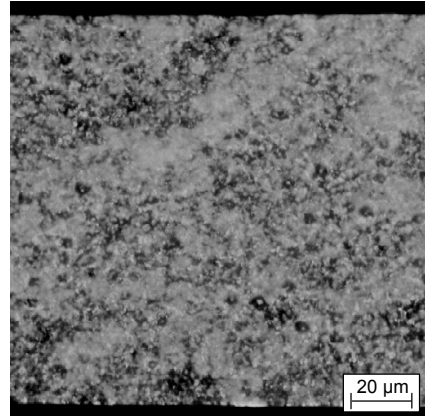


Abb. 20: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-2 – leicht gedreht; ohne Zellen

Elektrolyt [c/l] :	0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat – ZS4-2
Bemerkungen :	homogene graue Schicht; starke FE

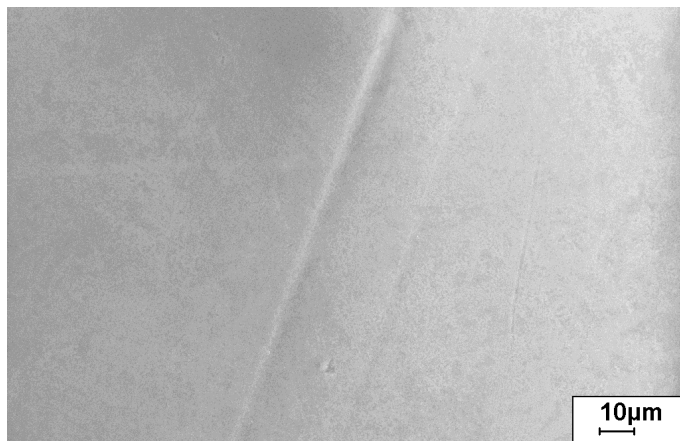
3.1.3.6. Probekörper 6 – Cercon®

Abb. 21: REM-Aufnahme der Oberfläche von Cercon®

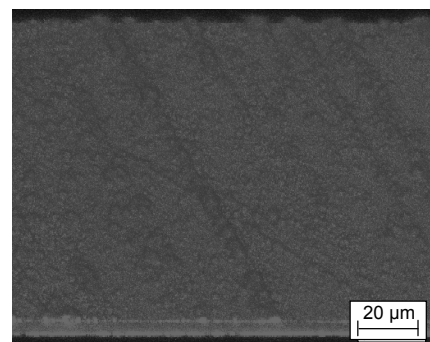
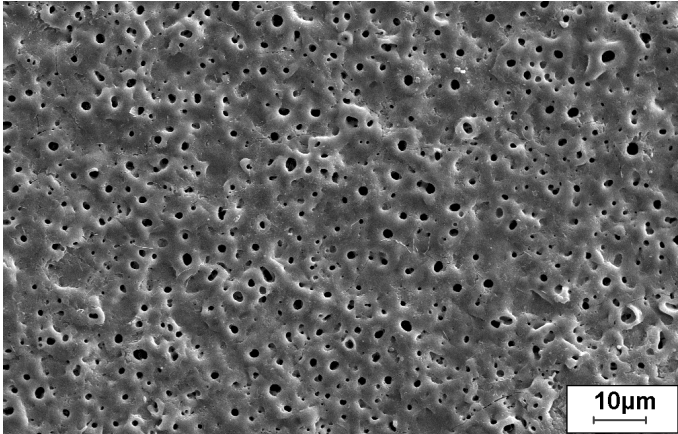
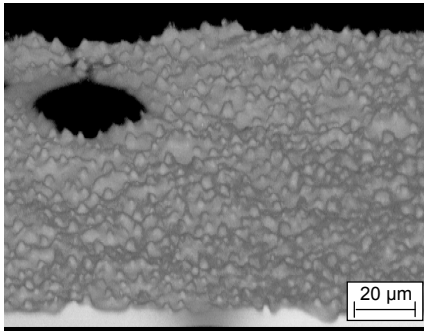


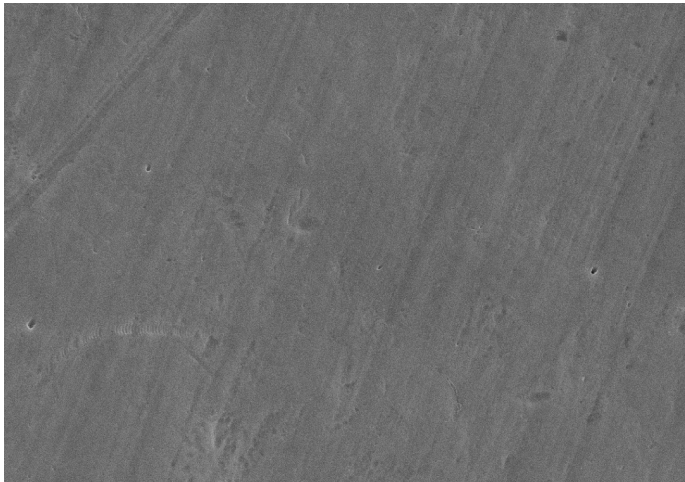
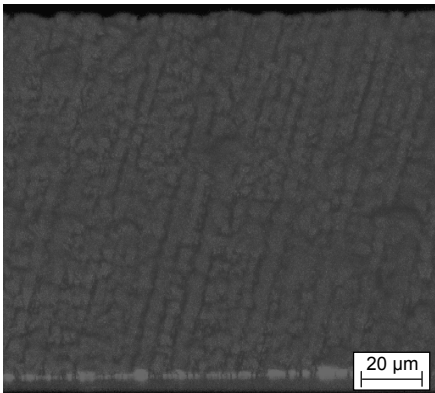
Abb. 22: LSM-Aufnahme der Oberfläche von Cercon® – leicht gedreht; ohne Zellen

Bemerkungen :	<ul style="list-style-type: none"> · Dichte: 6,05 g/cm³ · Offene Porosität 0,00 % · Mittlere Kristallitgröße: 0,2 - 0,5 µm · Kubische Kristalle: <20,0 % · Hauptanteil: Tetragonale Kristalle, Monokline Kristalle 2,0-3,0 % · Chemische Zusammensetzung: <ul style="list-style-type: none"> · > 92,0 % ZrO₂ · 5,0 % Y₂O₃ · <3,0 % restliche Bestandteile (Brevier, 2003)
---------------	--

3.1.3.7. Probekörper 7 – Ticer®

 <p>10µm</p>	 <p>20 µm</p>
Abb. 23: REM-Aufnahme der Oberfläche von Ticer®	Abb. 24: LSM-Aufnahme der Oberfläche von Ticer® – leicht gedreht; ohne Zellen
Elektrolyt [c/l] :	40 g Ca(H ₂ PO ₄) ₂
Bemerkungen :	graue, glatte Schicht

3.1.3.8. Probekörper 8 – CPT

<div><p>SE1 25.00 kV 1.00 K X WD = 22 mm 10 µm</p></div> <div>Abb. 25: REM-Aufnahme der Oberfläche von CPT</div>		<div><p>20 µm</p></div> <div>Abb. 26: LSM-Aufnahme der Oberfläche von CPT – leicht gedreht; ohne Zellen</div>
Elektrolyt [c/l] :	kommerziell reines Titan (CPT)	
Bemerkungen :	maschinierter Oberfläche	

Tab. 3: Übersicht über die Zusammensetzung der Elektrolytlösungen der Probekörper 1 – 5 und 7 und des Materials der Probekörper 6 und 8

Probekörper	Zusammensetzung der Elektrolyte			
PK 1 – ZSE	0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat	0,3 l 15 % KF Lsg.		
PK 2 – ZSG	0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat	0,3 l 15 % KF Lsg.	0,015 l konz. Phosphorsäure	
PK 3 – ZSG ½	0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat	0,3 l 15 % KF Lsg.	0,015 l konz. Phosphorsäure	Wasser 1:1
PK 4 – ZS4-0,5	22 g/l Zirkonium(IV)-sulfat			
PK 5 – ZS4-2	0,124 mol/l Zirkonium(IV)-sulfat			
PK 6 – Cercon®	>92 % ZrO_2 + 5,0 % Y_2O_3			
PK 7 – TICER®	40 g $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$			
PK 8 – CPT	reines Titan			

3.2. Methode

3.2.1. Anzucht der Knochenzellen

Das Knochengewebe wird mit frischen PBS gespült und in einer sterilen Werkbank von Blut gereinigt. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wird das Knochenmaterial mit 0,25-prozentiger Kollagenase im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und einer Luftfeuchte von 95 % für 30 Minuten inkubiert. Danach wird der Überstand abpipettiert und verworfen. Dem Knochenmaterial wird nun erneut Kollagenase zugesetzt, um die Knochenzellen aus den Knochenstücken herauszulösen. Die Kollagenasemischung wirkt zwei Stunden auf das Knochenmaterial ein. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Überstand erneut abgesaugt, in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 150 G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, das Pellet mit 1 ml Kulturmedium aufgefüllt und resuspendiert, in eine 25 cm³ Kulturflasche pipettiert und mit 2 ml frischem Nährmedium aufgefüllt. Die Kulturflasche wird für 7 Tage in einem Brutschrank mit 37°C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Gehalt aufbewahrt. Eine Bewegung der Kulturflasche in dieser Zeit ist zu vermeiden, um das Wachstum der Zellen auf dem Flaschenboden zu begünstigen (Abb. 27). Danach erfolgt jeden dritten Tag der Austausch des auf 37°C vortemperierten Kulturmediums, sowie die mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums.

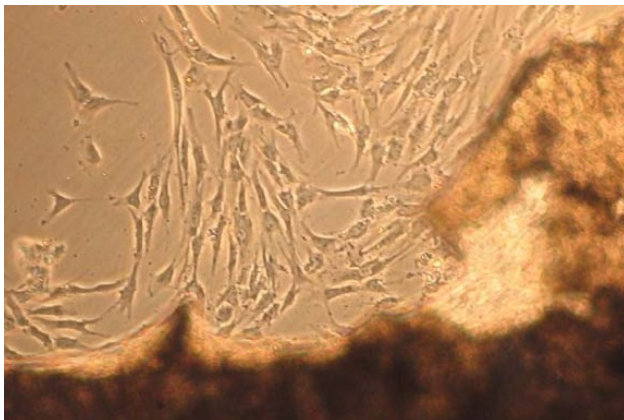


Abb. 27: Arbeitsfoto der Zellanzucht, 200-fache Vergrößerung, inverses Mikroskop

3.2.2. Zellkultivierung

3.2.2.1. Erste Subkultur

Die erste Subkultur entsteht, wenn die Primärzellen ein konfluentes Wachstum erreichen und den kompletten Boden der Kulturflasche bedeckt haben. Das Nährmedium wird abpipettiert und mit kalzium- und magnesiumfreiem PBS gespült.

Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, erfolgt die Inkubation mit einer Trypsin-PBS-Lösung im Brutschrank bei 37°C für eine Minute. Bis auf 0,5 ml wird der gesamte Überstand entnommen und die Zellkultur nochmals für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Der Vorgang wird mikroskopisch kontrolliert. Durch leichtes Klopfen an dem Boden der Kulturflasche lösen sich die Zellen ab. Zum Stoppen der Enzymaktivität wird frisches Nährmedium der Kultur zugesetzt und die Zellen vorsichtig gespült. Diese Zellsuspension wird wieder abpipettiert, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 2 ml frischem Medium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wird in 75 cm³ fassenden Zellkulturflaschen überführt und mit 14 ml frischem Kulturmedium aufgefüllt. Das Medium wird alle drei Tage gewechselt, solange bis die Zellen wieder konfluent sind.

3.2.2.2. Zweite Subkultur

Für die zweite Subkultur wird der konfluente Zellrasen, wie unter 3.2.2.1. beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst. Diese Zellen werden danach zentrifugiert und mit einem Nährmedium resuspendiert. Die Suspension wird auf sechs weitere Zellkulturflaschen (75 cm³) aufgeteilt und im Brutschrank bis zur Konfluenz aufbewahrt. Der Wechsel des Nährmediums erfolgt jeden dritten Tag, dabei wird das Zellwachstum regelmäßig mikroskopisch kontrolliert.

3.2.3. Versuchsvorbereitung

Bevor die Probekörper in die Kammern der Chamber Slides eingebracht werden können, werden sie mit Propanol gereinigt, mit destilliertem Wasser gespült, an der Luft getrocknet und anschließend bei 134°C autoklaviert. Danach konnten in alle acht Kammern des Chamber Slide je ein Probekörper (vgl. Abb. 28) eingebracht werden. Es werden insgesamt vier dieser Chamber Slides zur weiteren Bearbeitung angelegt.

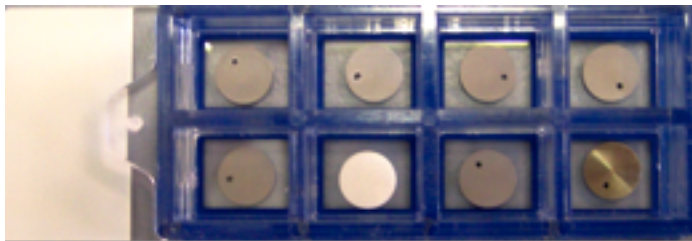


Abb. 28: Chamber Slide mit Probekörpern

3.2.4. Markierung der Probekörper

Nach dem 3., 5., 7. und 10. Tag werden jeweils die Chamber Slides mit den Prüfkörpern aus dem Brutschrank entnommen und der Überstand abgesaugt. Das Zellwachstum wird mit 4-prozentigem Paraformaldehyd beendet. Danach kann das Antigen fixiert und für den Antikörper zugänglich gemacht werden.

Bei allen folgenden Arbeitsschritten wird unter Lichtabschluss gearbeitet. Hier-nach erfolgt die Inkubation der Zellen mit 10-prozentigem Ziegennormalserum mit 2-prozentigem bovinen Serumalbumin (BSA) in PBS für 60 Minuten auf dem Schüttler. Nach der Reaktionszeit wird der Überstand abpipettiert und es erfolgt die Zugabe des Primärantikörpers für BSP in der Verdünnung von 1:100 in PBS mit 2 % BSA für 16 Stunden im Kühlschrank bei 4°C. Bei dem Primärantikörper handelt es sich um einen monoklonalen-anti-humanen-BSP-Antikörper.

Nach dieser Zeit werden die Präparate vier mal 5 Minuten auf dem Schüttler mit PBS gespült. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper ZAM-Cy3 für 30 Minuten an die Primärantikörper und die erneute dreimalige

Spülung mit PBS für je 5 Minuten. Um auch die Zellkerne fluoreszenzoptisch sichtbar machen zu können, werden diese mit der DAPI-Färbung markiert.

Hierzu wird 1 mg DAPI mit 1 ml reinem absolutem Alkohol gelöst und als Gebrauchslösung 1:1.000 in PBS verdünnt. Diese Lösung wirkt 1 Minute auf die Probekörper lichtgeschützt ein. Im Anschluss werden die Probekörper zweimal mit PBS je 5 Minuten und zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Färbung der Objekte mit DAPI wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt, da es für die Auswertung der unterschiedlichen Oberflächen der Probekörper sekundär war.

Um die fertigen Präparate unter dem Mikroskop untersuchen zu können, werden die Kammern der Chamber Slides abgetrennt, auf die einzelnen Probekörper ein Tropfen Eindeckmedium pipettiert und mit einem Deckglas verschlossen. Bis zur Auswertung erfolgt die Lagerung der Präparate im Kühlschrank, um die Austrocknung des Mediums zu verhindern.

3.2.5. Untersuchung der Probekörper mit dem Laser-Scanning-Mikroskop

Die Auswertung der Osteoblastenaktivität und der BSP-Expression auf den Probekörpern erfolgt mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, dem LSM 5 PASCAL von der Firma Carl Zeiss.

Ein aufrechtes Stativ, das Axioskop 2 FS MOT ebenfalls der Firma Carl Zeiss, bildet dabei die Basis des ganzen Systems.

Um die zweidimensionale Objektebene vollständig erfassen zu können, muss als erstes das Abrastern des Probekörpers mit dem fokussierten Laserstrahl Punkt für Punkt und Linie für Linie erfolgen. Der Laserstrahl wird dazu in X/Y-Richtung ausgelenkt und das Scanfeld in 512 x 512 Pixel zerlegt, wodurch eine Bilderstellung von 2-3 Bildern pro Sekunde ermöglicht wird. Über einen Photomultiplier (PMT) erfolgt die pixelweise Detektion der emittierten Fluoreszenzstrahlung vom Probenort. Um die Bildinformationen digital darzustellen, wird das elektrische Signal nach dem Photomultiplier digitalisiert. Das ausgewählte Scanfeld wird punktweise bestrahlt und die Fluoreszenz punktweise gemessen. Wenn der Laserstrahl über den Probekörper bewegt wird,

werden die kompletten Informationen über das gesamte Untersuchungsfeld ermittelt (vgl. Abb. 29) (Zeiss, 2002).

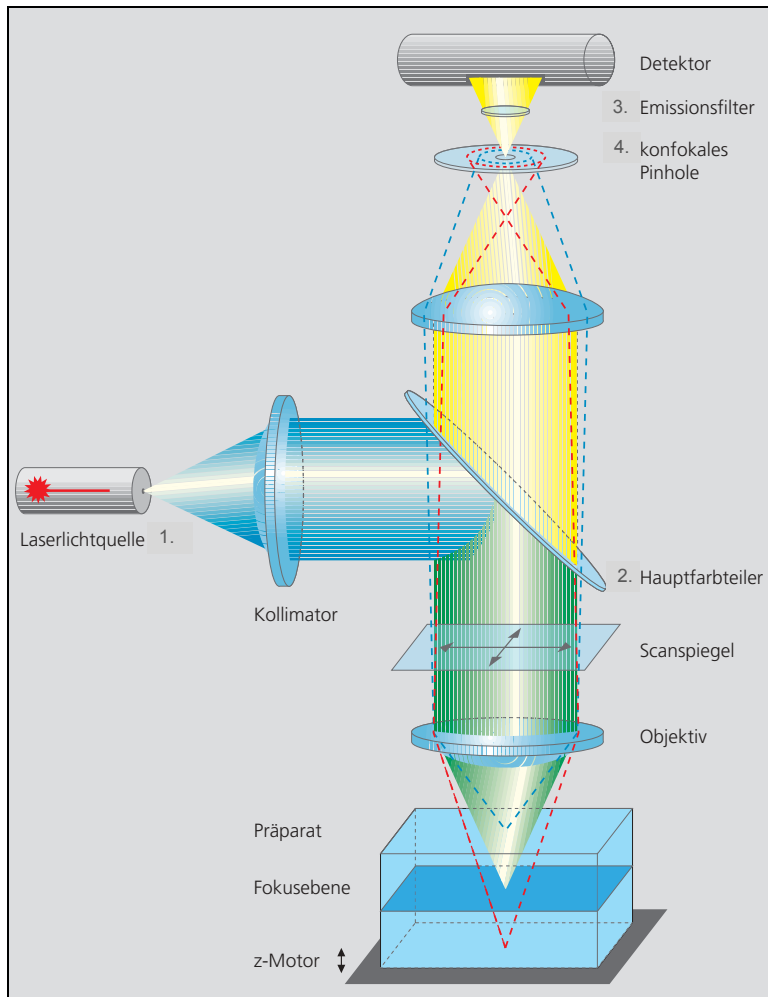
Dem LSM stehen für die mikroskopischen Untersuchungen generell verschiedene Laser zur Verfügung. Für die Untersuchung der leeren Probekörper und der mit den humanen Knochenzellen belegten Probekörper wird ein, die Fluoreszenzfarbstoffe mit 543 nm anregender Laser verwendet, welcher daraufhin Licht über ein Emissionsspektrum von einer Wellenlänge von LP 560 nm aussendet.

Beim konventionellen Lichtmikroskop wird die Objekt-zu-Bild-Information parallel für alle Objektpunkte umgewandelt. Ein weiterer Unterschied zum konventionellen Lichtmikroskop ist die beim LSM vorhandene konfokale Blende (Pinhole), die zur Objektebene parallel in einer Zwischenbildebene angeordnet ist. Somit kann durch den Detektor nur Licht detektiert werden, das diese Blende überschritten hat. Der Durchmesser der Blende kann sehr klein sein (punktförmige Detektion). Alle Bereiche des Objektes, die durch die Blende nicht erfasst werden, werden im Bild unsichtbar gemacht, womit eine kontraststeigernde und streulichtunterdrückende Wirkung erzielt werden kann (Zeiss, 2002).

Mit dem konfokalen LSM kann aus einem Zellverbund eine dünne Gewebeschicht dargestellt werden. Dieser optische Schnitt weist in der vorliegenden mikroskopischen Untersuchung eine z-Ausdehnung von 0,43 μm auf. Bei einem konventionellen Mikroskop ist dies nicht möglich. Hier können Objekte nur scharf abgebildet werden, wenn diese nicht dicker sind, also die z-Ausdehnung nicht größer ist, als die wellenoptische Schärfentiefe des Objektes. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass je kleiner die Blende ist, desto schärfer wird das Objekt abgebildet. Ist diese Voraussetzung nicht erfüllt, kann das Objekt mit dem konventionellen Mikroskop nicht scharf abgebildet werden (Zeiss, 2002).

Durch die Möglichkeit des optischen Schneidens bei dem LSM kann das Objekt nicht nur in einer Ebene klar dargestellt werden, sondern es besteht die Möglichkeit einen dreidimensionalen Datensatz zu erzeugen, der im Folgenden Stack genannt wird. Dieser ergibt sich durch eine Verschiebung der Fokussposition in dem Probekörper, weil somit aufeinanderfolgende Schnitte erzeugt

werden. Die Verschiebung der Fokusposition entsteht durch die Änderung der z-Richtung in Bezug zum Probekörper bzw. zum Objektiv (Zeiss, 2002).



1. Laserlichtquelle zum Hauptfarbverteiler
2. Vom Farbverteiler zum einen zum Objektiv, wo das Licht gebündelt und in die Probe fokussiert, zum anderen an den Detektor geleitet wird
3. Am Emissionsfilter wird der brauchbare Wellenlängenbereich selektiert
4. Die konfokale Blende (Pinhole) macht das nicht fokussierte Licht unbrauchbar

Abb. 29: Strahlengang in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, 2002)

Es können nun genaue Informationen über die vorhandenen Zellen auf dem Probekörper gewonnen, in unterschiedlichen Ebenen betrachtet und untersucht werden. Dieser Stack liefert aber auch Erkenntnisse über die Räumlichkeit der humanen Knochenzellen. Genauigkeit und Qualität der Informationen sind von

der vertikalen Dimension des Schnittes und vom Abstand der einzelnen Schnitte abhängig. Zwischen den einzelnen Bildaufnahmen beträgt die Abtastrate $0,43\ \mu\text{m}$ mit einer Bildüberschneidung von $0,02\ \mu\text{m}$ in der z-Ausdehnung. Somit entsteht ein Datensatz an Bildern und Informationen, die mit der LSM 5 Pascal Software bearbeitet werden kann. Es können die Daten dann in den unterschiedlichen Ebenen X/Y, X/Z oder Y/Z dargestellt werden. Somit ist es möglich die 90° -Projektion aus dem 3D-Bildstapel zu erzeugen.

Mit der LSM 5 Pascal-Software ist es nun möglich, die Steuerung und die Konfiguration der Mikroskopfunktion, die Lasermodule und das Scanmodul von dem Mikroskop zu übernehmen. Die aufgenommenen Bilder, die 3D-Bildstapel (Stack) und die 90° -Projektionen, können gespeichert und später wiederhergestellt werden. Mit der Software besteht die Möglichkeit, alle gewonnenen Aufnahmen zu bearbeiten. Helligkeit, Kontrast und Bildschärfe können geändert werden, um ein optimales Bild zu erhalten.

Um eine reelle optische Abbildung der Probekörper zu erhalten, kommen das Objektiv Plan-Apochromat 10x/05 für eine Übersichtsaufnahme und das Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,4 oil für die Detaildarstellung zum Einsatz.

3.2.6. Auswertung der 3D-Bildstapel

Die acht vorliegenden Probekörper werden mit dem LSM 5 Pascal und dem Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,4 oil untersucht und die darauf vorhandenen Knochenzellen optisch dargestellt. Dazu werden auf jedem Probekörper fünf Untersuchungsflächen ausgewählt und jeweils ein Bildstapel (vgl. Abb. 31) angefertigt.

Die ausgewählten Bereiche erfassen jeweils eine Ausdehnung von $148\ \mu\text{m} \times 148\ \mu\text{m}$. Das LMS fertigt nach manueller Markierung der „mark-first“ und „mark-last“ mittels der Software den Bildstapel an, indem jeweils nach $0,41\ \mu\text{m}$ ein einzelnes Bild erzeugt wird. Dieser Bildstapel wird gespeichert, um die volumetrische Messung der Expression des BSP der humanen Osteoblasten vorzunehmen, eine 2D-Darstellung auszuwerten und eine 90° -Projektion zu berechnen.



Abb. 30: Abstrakt dargestellter Probekörper mit fünf ausgewählten Bereichen zur fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme als Stack

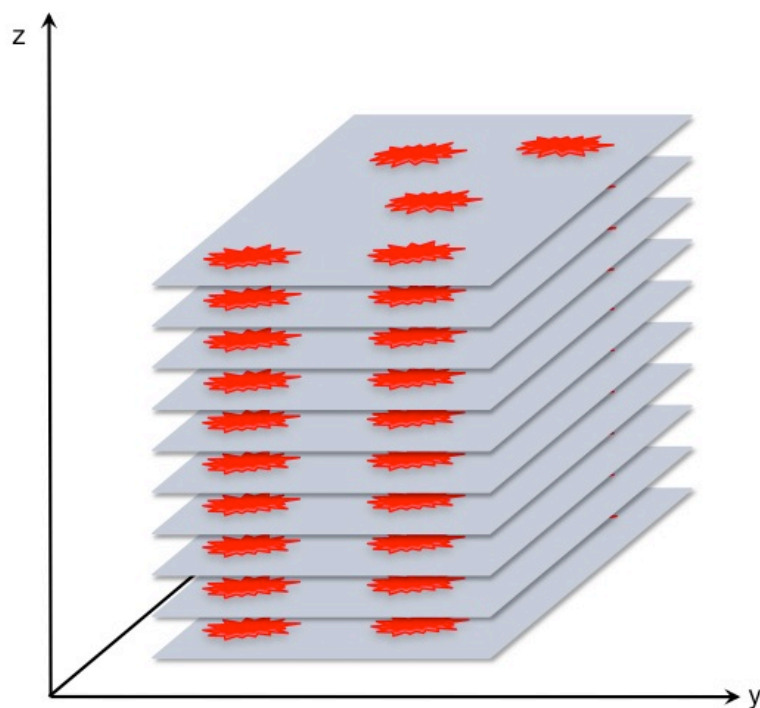


Abb. 31: Bildarchitektur – Abstrakte Darstellung eines Stacks mit Osteozyten als rotes Element

z – vertikale Ausdehnung - Einzelaufnahmen als Stack zusammengefasst
x – im LSM – Abmessung 412 μm , als Breite der untersuchten Fläche
y – im LSM – Abmessung 412 μm , als Länge der untersuchten Fläche

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.40g wird aus den zuvor angefertigten Stacks die Auswertung hinsichtlich der BSP-Expression der Osteoblasten vorgenommen. Aus den Stacks kann nun mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes jedes benötigte Bild herauskopiert und abgespeichert werden. Es wird nur jedes zweite Bild verwendet, da es eine Überlappung der einzelnen Aufnahmen von 0,02 μm gibt. ImageJ ermittelt die Größe der Expressionsflächen von BSP auf der zu untersuchenden Ebene in μm^2 , welche mit der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel abgespeichert werden. Die Expressionsflächen dieser einzelnen Ebenen von einem Stack an einem Tag von je einem Probekörper werden addiert. Es ergibt sich ein BSP-Expressionsvolumen in μm^3 innerhalb eines Stacks bzw. einer laser-scanmikroskopischen Aufnahme. Das Expressionsvolumen wird tabellarisch mit Microsoft Excel erfasst und der Mittelwert der fünf von einem Probekörper erzeugten Stacks berechnet. Außerdem kann die Standardabweichung bestimmt werden. Die Anzahl der zu vergleichenden Summen der Expression liegt bei circa 1.600, die Anzahl der Volumina bei 160. Die BSP-Expressionsvolumina werden in Säulendiagrammen grafisch dargestellt und ausgewertet.

Zu der volumetrischen Untersuchung wird noch eine 2D-Darstellung der BSP-Expression erstellt. Durch das Programm ImageJ kann aus dem Stack eine Ebene entwickelt werden, die alle Expressionsflächen des BSP aus dem Stack enthält. Dabei projizieren sich alle vorhandenen BSP-Expressionsflächen auf die oberste Ebene. Es entsteht ein 2D-mikroskopisches Bild. Flächen, die sich im Stack genau überlagern, werden bei dieser Darstellung nur einfach berücksichtigt. Die Größe der Expressionsfläche in μm^2 wird mit ImageJ ermittelt. Danach erfolgt die Analyse und grafische Darstellung der Ergebnisse dieser Auswertungsmethode.

Eine weitere Untersuchung und Auswertung stellt die Erzeugung der 90°-Projektion dar. Die 90°-Projektionen werden aus den Stacks mittels der LSM-Software berechnet.

Mit Hilfe der Projektionen lässt sich die vertikale Dimension der Probekörper an den verschiedenen Versuchstagen bestimmen, um einen Hinweis auf das Knochen-Implantat-Interface bei unterschiedlichen Oberflächenstrukturen zu erhalten.

Als Beispiel für eine laserscanmikroskopische Aufnahme wird die Abb. 32 dargestellt. Es zeigt längliche Osteoblasten mit Zellkernen. Die BSP-Expression / BSP-Ansammlung in den Knochenzellen sind als weiße Cluster dargestellt, deren Ausmaße, wie beschrieben, mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ berechnet werden.

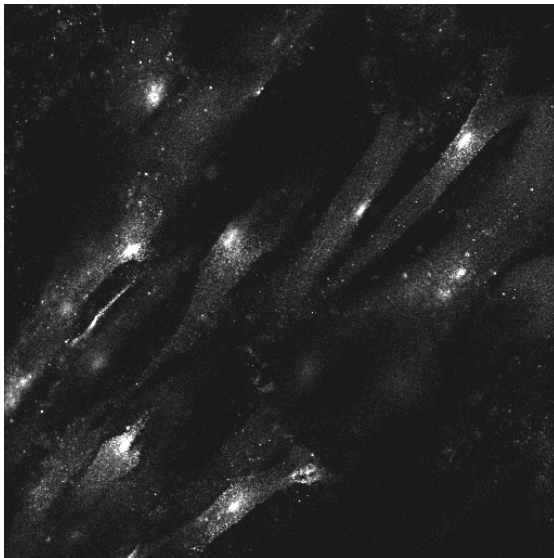


Abb. 32: Beispiel für eine LSM-Aufnahme aus einem Stack eines Probekörpers mit dem LSM

Die Abb. 33 stellt die durch die LSM-Software berechnete 90°-Projektion eines Stacks dar. Es zeigt die vertikale Ausdehnung der aufgelagerten Osteoblasten, den Knochen-Implantat-Kontakt und auch die BSP-Expression.

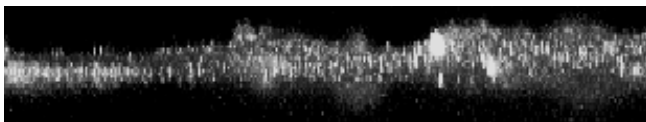


Abb. 33: Beispiel für eine 90°-Projektion eines Probekörpers

4. Ergebnisse

4.1. Laser-Scanning-Mikroskopie und Bestimmung der BSP-Expression

Die mikroskopischen Aufnahmen sowie die Darstellung der Osteozyten und die Auswertung der BSP-Expression auf den acht verschiedenen Probekörpern erfolgten mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops LSM 5 Pascal und eines Computers. Mit der gleichnamigen Software sowie dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.40g wurde die Auswertung der BSP-Expression der Probekörper durchgeführt. Die Speicherung der ermittelten BSP-Expressionsvolumina, die Bestimmung der daraus folgenden Mittelwerte und die Standardabweichungen sowie deren grafische Darstellung in Säulendiagrammen erfolgte mit dem Tabellenbearbeitungsprogramm Microsoft Excel.

Zur Oberflächengestaltung der leeren Probekörper (vgl. Abb. 12 bis Abb. 26) konnte bei dem maschinenbearbeiteten Titan (PK 8) eine glatte Oberfläche mit Graten unregelmäßiger Abstände und Höhe dargestellt werden. Die elektrolytisch hergestellten Oberflächen weisen eine raue Morphologie mit mikroporöser Struktur auf, wobei die Poren unregelmäßig angeordnet und unterschiedliche Durchmesser aufweisen. Das Cercon® (PK 6) hingegen, zeigt ähnlich wie das CPT (PK 8) eine glatte und homogene Oberflächenstruktur.

4.2. Grafische und visuelle Darstellung der BSP-Expression der Probekörper

Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ 1.40g wurde die Datenermittlung durchgeführt. Die ermittelten Werte werden in Säulendiagrammen grafisch dargestellt.

Es handelt sich zum einen um Diagramme, welche die mittelwertigen Expressionsvolumina von BSP der humanen Knochenzellen in μm^3 , aus dem untersuchten Messfeld von $148\ \mu\text{m} \times 148\ \mu\text{m}$ mit der für jeden Stack individuell definierten vertikalen z-Ausdehnung, darstellen. Die Stack-Darstellung wird ausgewertet und die Standardabweichung, um die Streuung um den Mittelwert kenntlich zu machen, wurde ebenfalls erfasst.

Zum anderen wurden als Vergleich Diagramme entwickelt, die die Werte der BSP-Expression nach summierter Projektion enthalten. Eine 2D-Darstellung ist hiermit die Grundlage der Auswertung. Die Expression wird jeweils in μm^2 angegeben.

Alle Diagramme sind als Säulendiagramme abgebildet, in Abhängigkeit vom 3., 5., 7. und 10. Versuchstag. Jeder einzelne Probekörper wird in dieser Art und Weise grafisch dargestellt.

Bei den Aufsichten handelt es sich um ein mikroskopisch ausgewähltes Untersuchungsfeld eines Probekörpers, welches als einzelner Slice (Bild) eines Stacks an dem jeweiligen Versuchstag bei unterschiedlichen Probekörpern gezeigt wird. Weiterhin sind die 90° -projizierten Aufnahmen des aufgenommenen Stacks veranschaulicht.

Der Maßstab der Abbildungen ist im Verhältnis mit der entstandenen 90° -Projektion vom LSM gleichzusetzen. Verdeutlicht wird hier das Knochen-Implantat-Interface mit der unterschiedlichen Expressionsrate von dem BSP, das in den aufgelagerten Osteoblasten vorhanden ist.

Außerdem wird jeweils die vertikale Dimension der Stacks an den einzelnen Versuchstagen bei den jeweiligen Probekörpern als grafische Auswertung dargestellt.

4.2.1. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 1 – ZSE

Die grafische Darstellung aus Abb. 34 zeigt die mittelwertige BSP-Expressionsvolumina der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen innerhalb eines Stacks von ZSE an den unterschiedlichen Versuchstagen. In der Abbildung ist vom 3. zum 5. Versuchstag ein Abfall der BSP-Expression zu verzeichnen, welche zum 7. Tag wieder leicht ansteigt und am 10. Versuchstag das Maximum der BSP-Expression der Osteozyten auf dem Probekörper erreicht.

Als vergleichende Darstellung dient das Diagramm der Abb. 35. Es ist der Mittelwert der BSP-Expression aus der Summe der einzelnen Slices, der sich auf die Oberfläche der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme projiziert, grafisch dargestellt. Eine 2D-Aufnahme wird erzeugt. Beim Vergleich der beiden Diagramme kann festgestellt werden, dass die Zu- und Abnahme der BSP-Expression an den einzelnen Versuchstagen korreliert. Die Expression ist in Abb. 35 am 5. Tag am niedrigsten und am 10. Tag ist das Maximum festzustellen.

Die Unterschiede in der vertikalen Dimension der Stacks an den Versuchstagen sind in Abb. 40 grafisch dargestellt. Diese nimmt vom 3. zum 7. Versuchstag ab, um am 10. Tag das Level des 5. Tages zu erreichen.

Bei den 90°-Projektionen ist das Expressionsverhalten, wie bei den 3D-Bildstapeln ebenso zu verzeichnen. Am 3. Tag (Abb. 41) sind deutliche Spikes zu erkennen, die den Bone-Implant-Contact (BIC) ausmachen und in ihrer Anzahl am 7. (Abb. 43) und 10. Tag (Abb. 44) noch weiter zunehmen. Diese sind unregelmäßig verteilt und die Cluster, die einen erhöhten Weißwert ausmachen, nehmen bei höheren Versuchstagen ebenfalls zu.

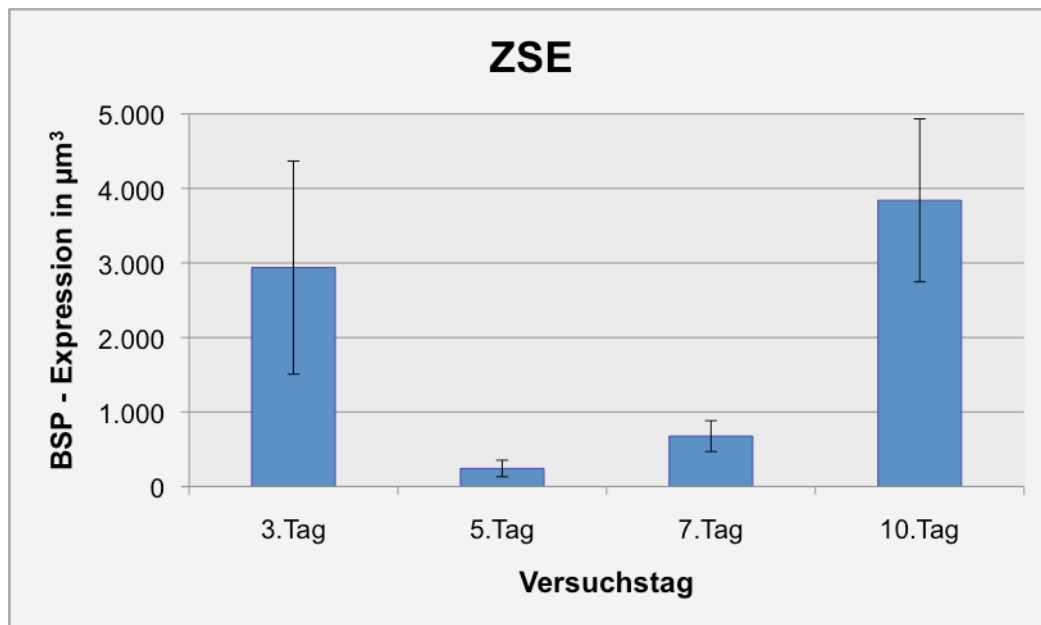


Abb. 34: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

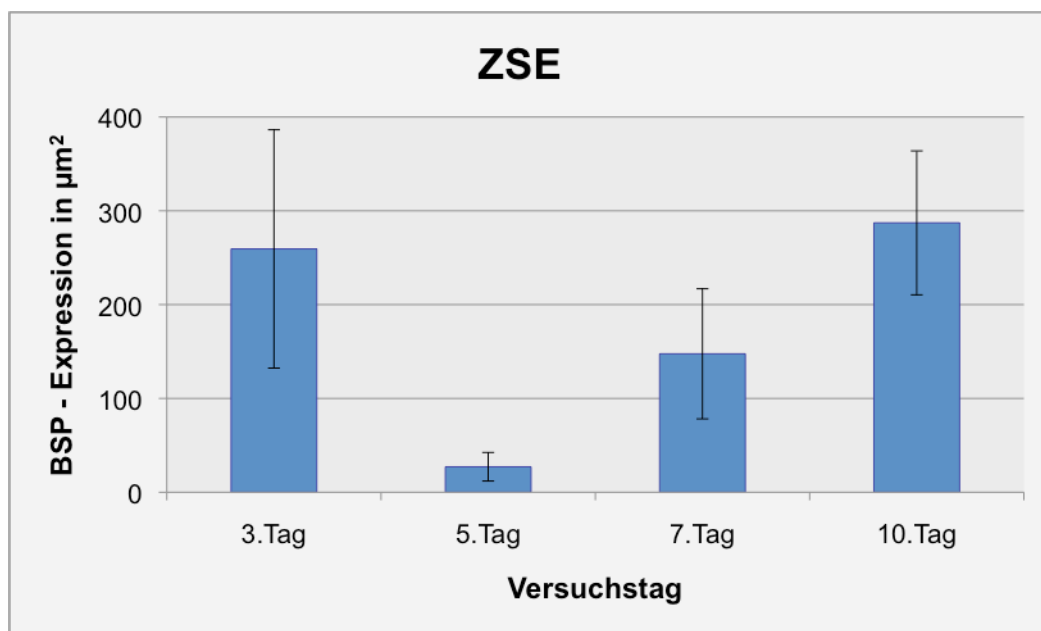


Abb. 35: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.1.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers ZSE in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

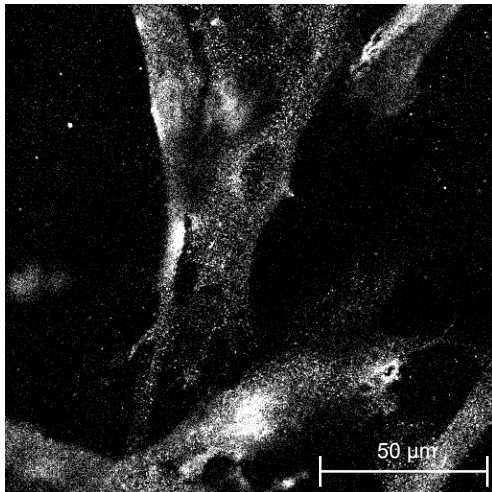


Abb. 36: LSM-Aufsicht des PK 1 – 3. Tag

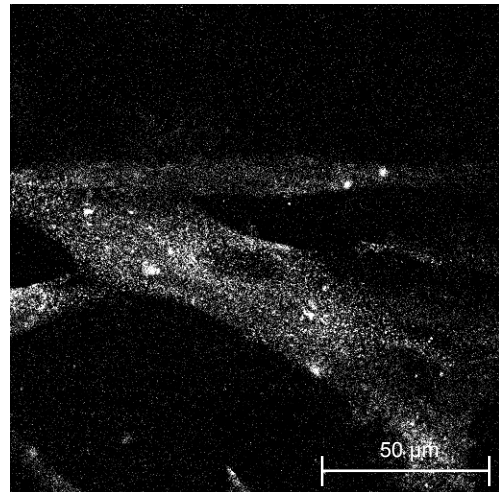


Abb. 37: LSM-Aufsicht des PK 1 – 5. Tag

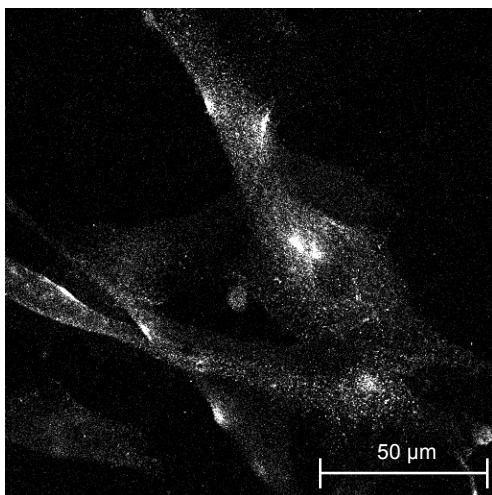


Abb. 38: LSM-Aufsicht des PK 1 – 7. Tag

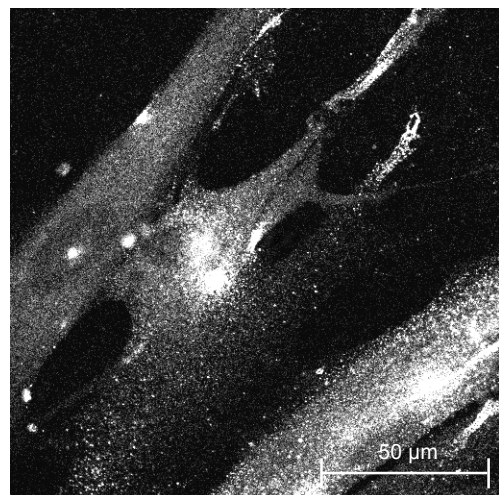


Abb. 39: LSM-Aufsicht des PK 1 – 10. Tag

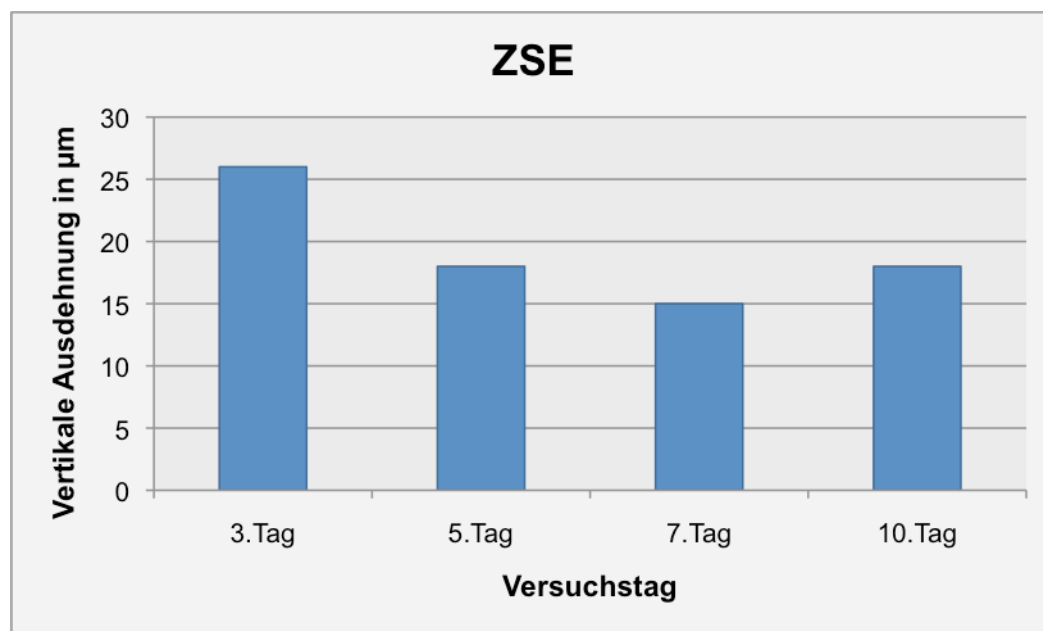


Abb. 40: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZSE

4.2.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion

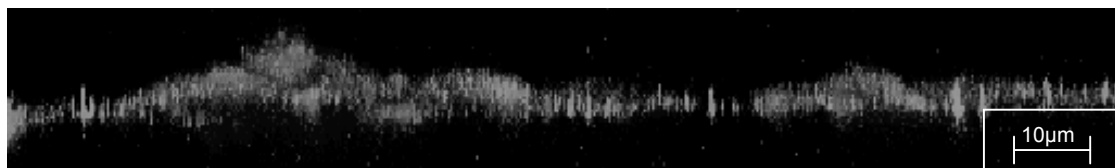


Abb. 41: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 3. Tag

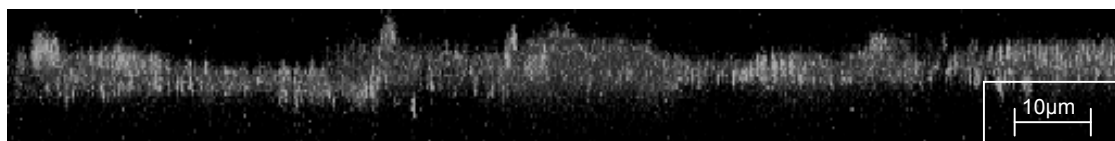


Abb. 42: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 5. Tag

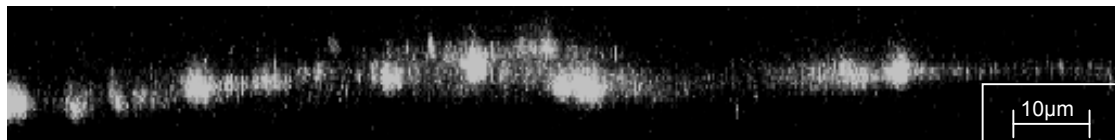


Abb. 43: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 7. Tag



Abb. 44: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 10. Tag

4.2.2. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 2 – ZSG

Aus dem Diagramm der Abb. 45 ist der Mittelwert der BSP-Expression innerhalb eines Stacks des Probekörpers ZSG an unterschiedlichen Versuchstagen dargestellt. Es ist eine abnehmende BSP-Expressionsrate vom 3. zum 7. Tag zu verzeichnen, um am 10. Tag wieder anzusteigen, aber nicht das Niveau vom 3. Versuchstag zu erreichen.

Als vergleichende Darstellung wird hier das Diagramm in Abb. 46 genutzt. Es stellt die summierende Projektion der BSP-Expression grafisch dar. Die BSP-Expression in der 2D-Darstellung harmonisiert mit der Expression innerhalb eines Stacks.

Bei den Draufsichten (Abb. 47 bis Abb. 50) ist eine Zunahme der Zellzahl bis zum 7. Versuchstag zu erkennen. Am 10. Tag ist die Anzahl der Zellen geringer. Das flächige Ausmaß der Zellen nimmt vom 3. zum 7. Versuchstag ab, um am 10. Tag wieder an Fläche zu zunehmen. Eine Clusterbildung ist vor allem am 3. und 10. Versuchstag erkennbar.

Die Abb. 51 zeigt die Unterschiede in der vertikalen Ausdehnung der Stacks. Am 3. und 7. Versuchstag ist eine annähernd identische Ausdehnung in der z-Richtung auszumachen. Die geringste vertikale Dimension der aufgelagerten Zellen ist am 10. Tag zu erkennen.

Die Abb. 52 bis Abb. 55 zeigen die 90°-Projektionen des Probekörpers ZSG am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag. Am 3. Tag sind viele unregelmäßig angeordnete Spikes ohne Clusteranordnung zu erkennen. Die Cluster sind am 5. und 10. Tag auszumachen. Am 10. Tag sind die Spikes regelmäßig angeordnet. Hier sind ebenfalls bei der 90°-Projektion aufgelagerte Zellen sichtbar. Die Höhe der Expression ergibt sich am 3. Tag bei der 90°-Projektion durch die hohe Anzahl der Spikes.

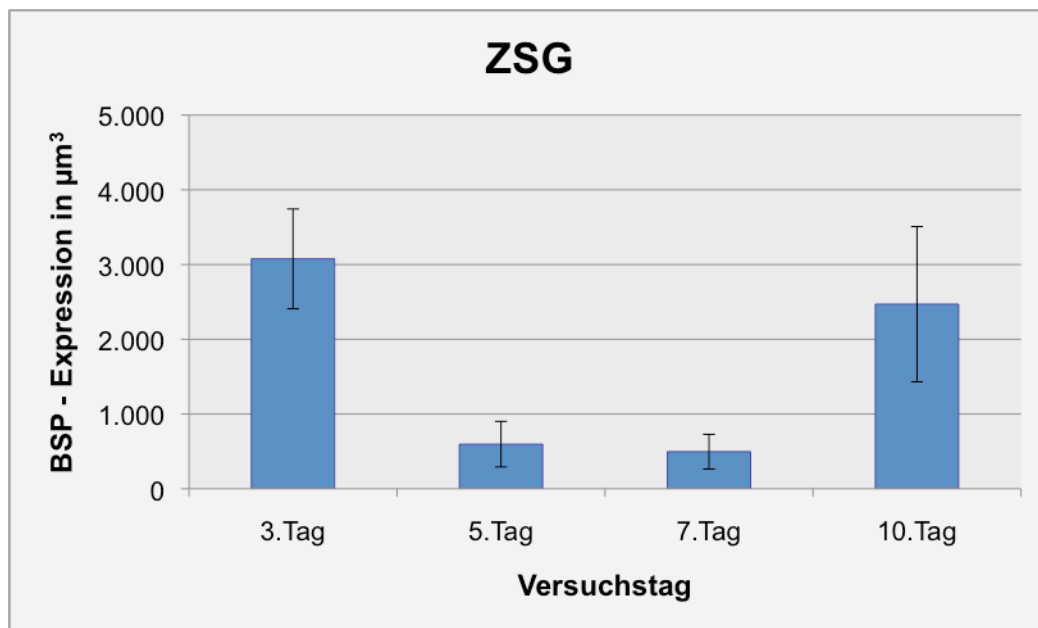


Abb. 45: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

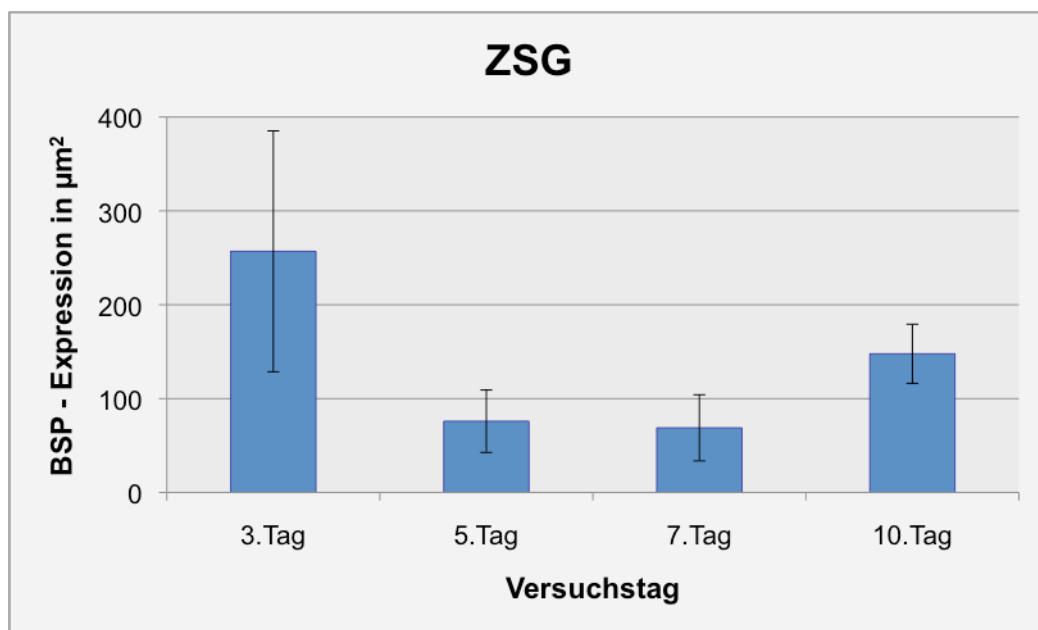


Abb. 46: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers ZSE in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

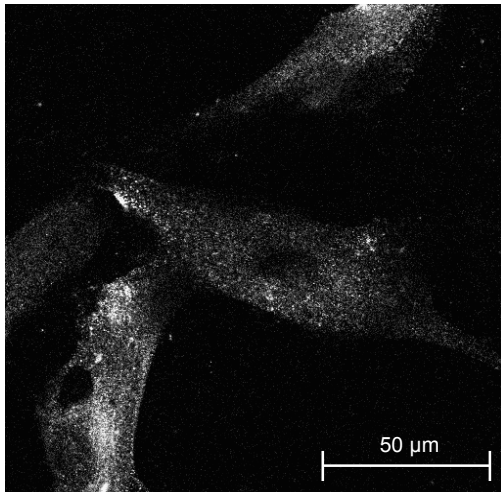


Abb. 47: LSM-Aufsicht des PK 2 – 3. Tag

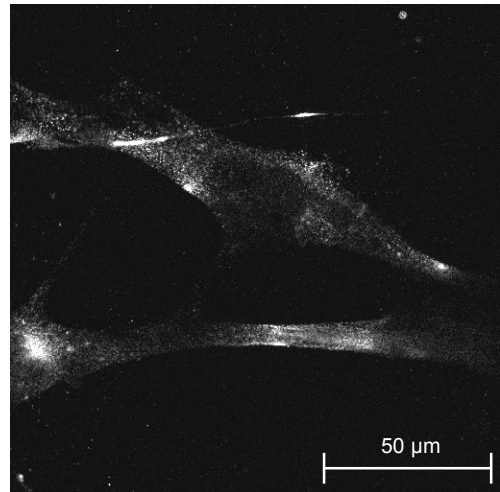


Abb. 48: LSM-Aufsicht des PK 2 – 5. Tag

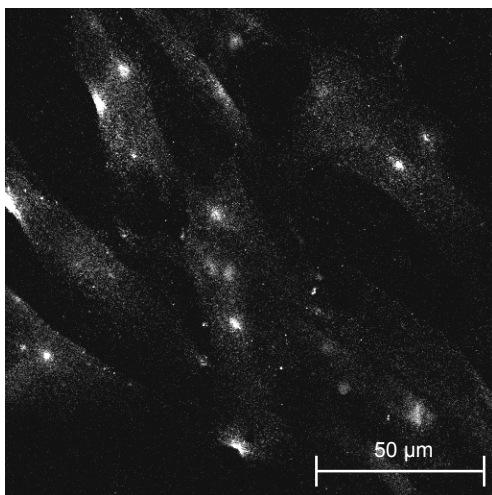


Abb. 49: LSM-Aufsicht des PK 2 – 7. Tag

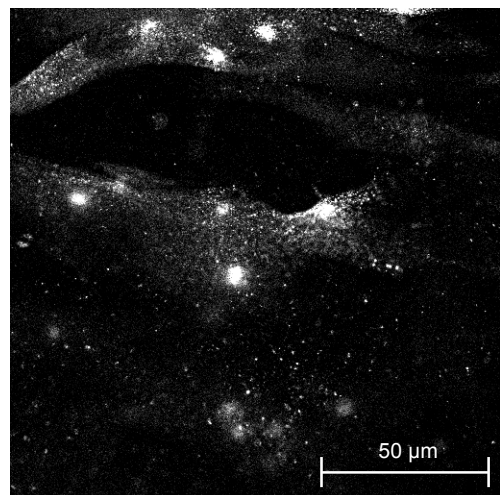


Abb. 50: LSM-Aufsicht des PK 2 – 10. Tag

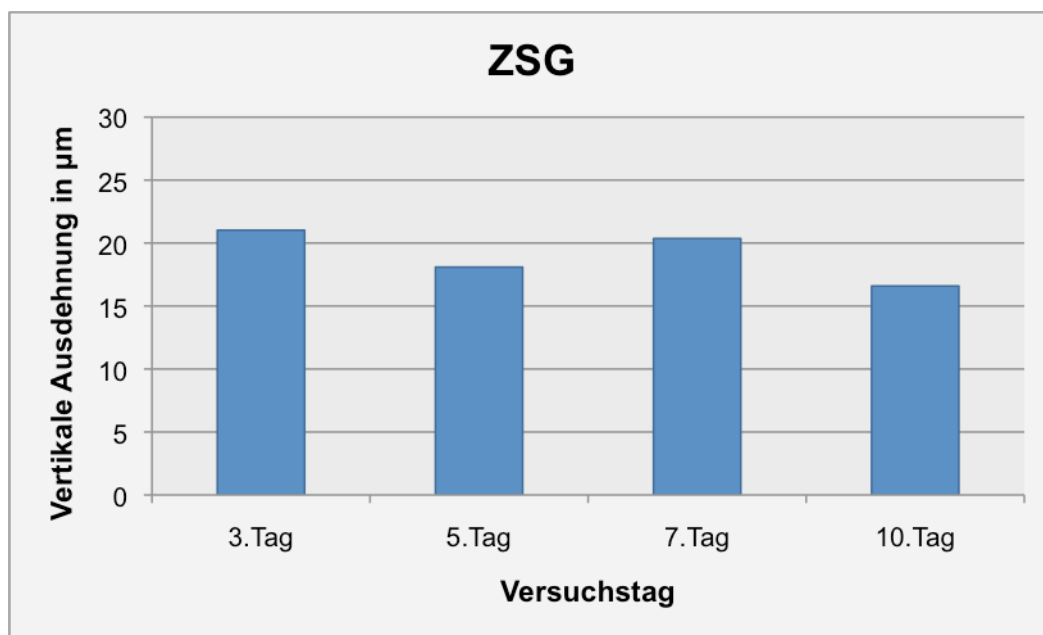


Abb. 51: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZSG

4.2.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion

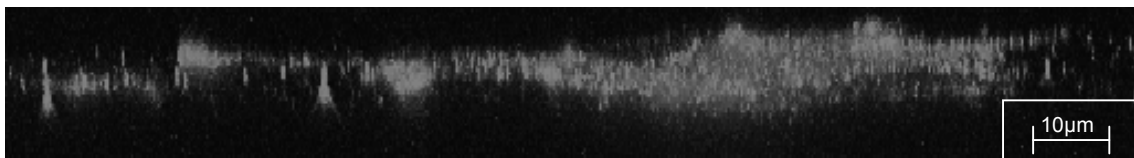


Abb. 52: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 3. Tag

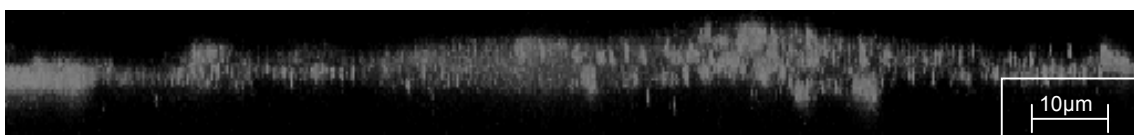


Abb. 53: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 5. Tag

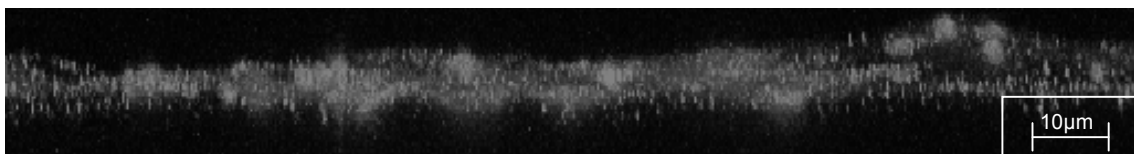


Abb. 54: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 7. Tag

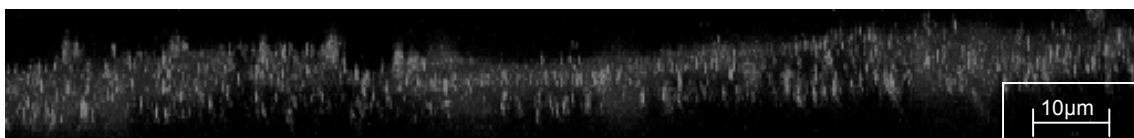


Abb. 55: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 10. Tag

4.2.3. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 3 – ZSG ½

In Abb. 56 sind die Mittelwerte der BSP-Expression des Probekörpers ZSG ½ innerhalb eines Stacks grafisch dargestellt. Am 10. Untersuchungstag ist die höchste Expressionsrate zu erkennen. Tag 3 und 5 zeigen annähernd gleiche Werte in den BSP-Volumina, welche jedoch geringer sind als am 10. Tag. Am 7. Versuchstag ist die geringste BSP-Expression zu verzeichnen.

Die Abb. 57 lässt die BSP-Expression der 2D-Darstellung nach Summation der Slices erkennen. Der 7. Tag zeigt auch wie in der 3D-Auswertung die niedrigste Expression.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen der Abb. 58 bis Abb. 61 ist eine deutlich erhöhte Zellanzahl am 10. Versuchstag zu erkennen. Am 1. Versuchstag ist eine Anhäufung an Osteozyten vorhanden, die zum 5. und 7. Tag abfällt. Eine Zunahme der BSP-Expression wird deutlich. Eine Ausnahme bildet der 7. Versuchstag, an dem im Diagramm (Abb. 56) ein Abfall festzustellen ist. Eine Cluster-Zunahme ist auszumachen.

Die vertikale Dimension der Stacks ist in Abb. 62 grafisch dargestellt. Die Stapelhöhe ist am 3., 7. und 10. Versuchstag annähernd gleich. Die z-Ausdehnung ist am 5. Tag leicht erhöht.

Alle 90°-Projektionen (Abb. 63 bis Abb. 66) zeigen eine Anordnung von Spikes. Diese sind am 7. und 10. Tag regelmäßig und gehäuft angeordnet. Eine klare Ausbildung ist erkennbar. Cluster sind nur im geringen Maß vorhanden. Eine Ansammlung ist vor allem am 7. Tag festzustellen. Am 10. Tag sind aufgelagerte Zellen sichtbar.

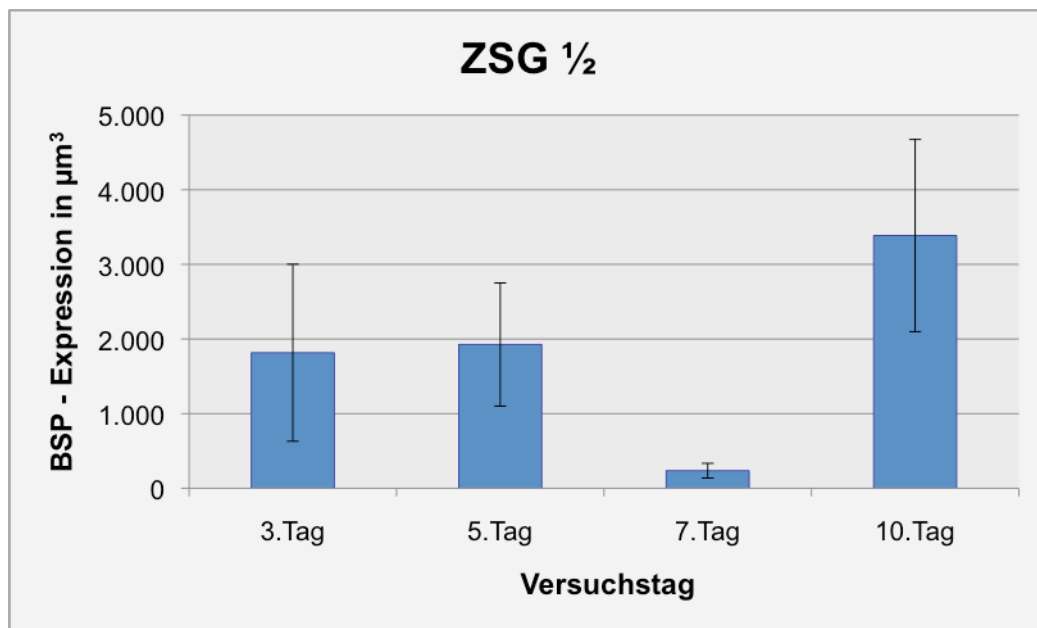


Abb. 56: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

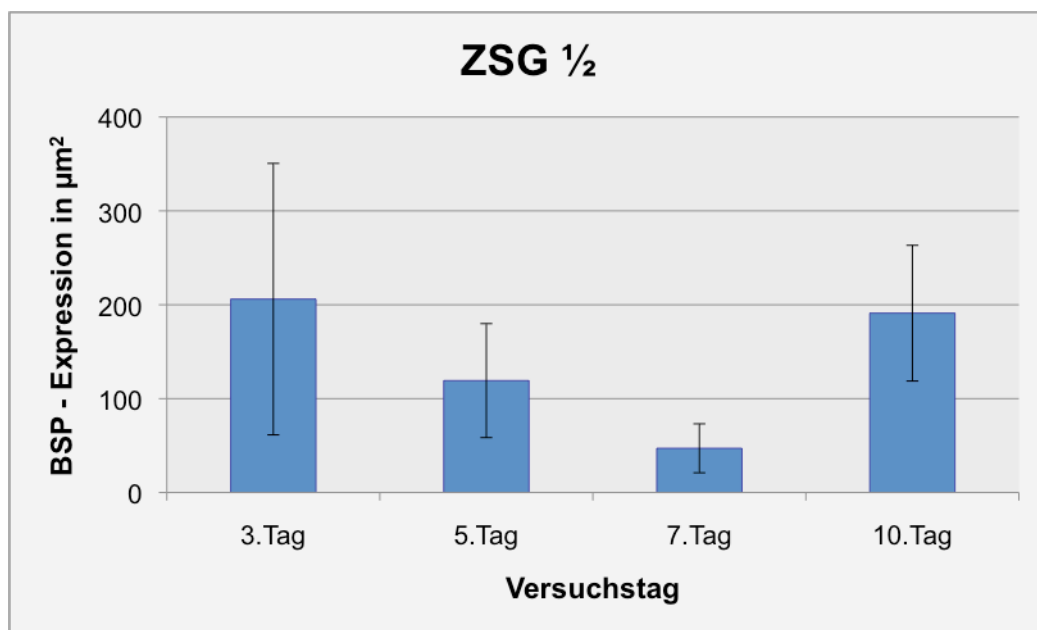


Abb. 57: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.3.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers ZSG $\frac{1}{2}$ in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

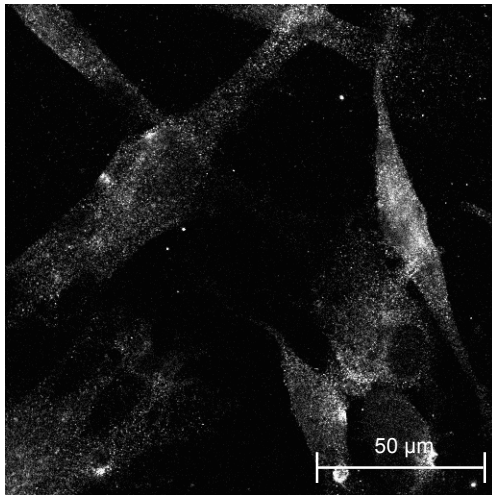


Abb. 58: LSM-Aufsicht des PK 3 – 3. Tag

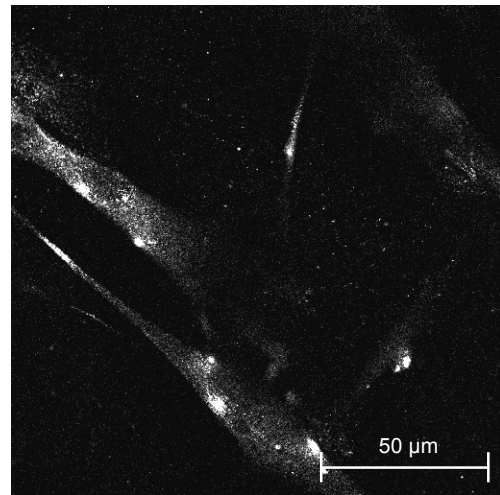


Abb. 59: LSM-Aufsicht des PK 3 – 5. Tag

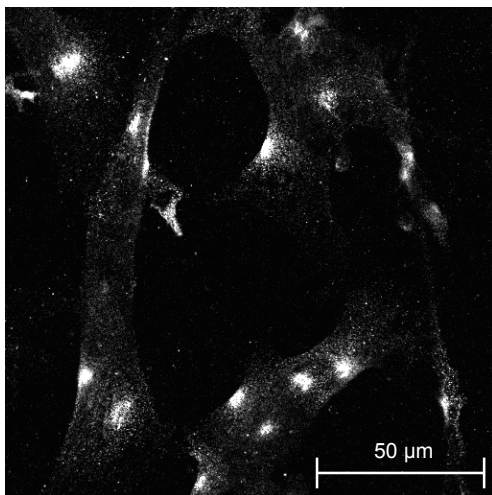


Abb. 60: LSM-Aufsicht des PK 3 – 7. Tag

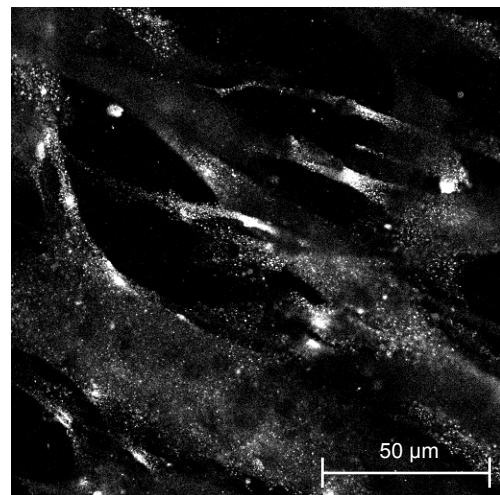


Abb. 61: LSM-Aufsicht des PK 3 – 10. Tag

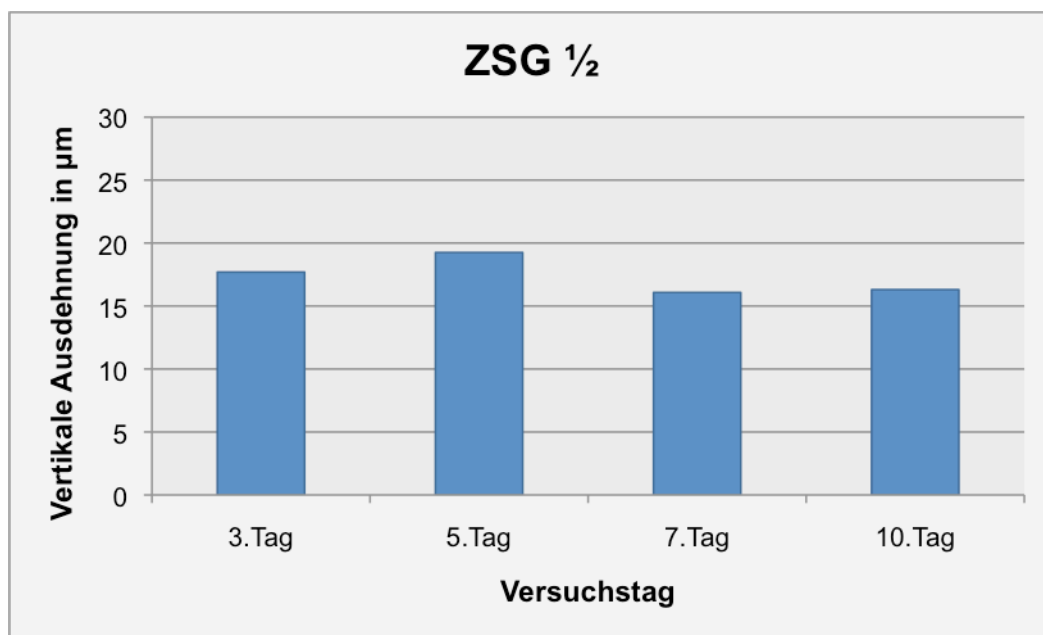


Abb. 62: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZSG $\frac{1}{2}$

4.2.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion

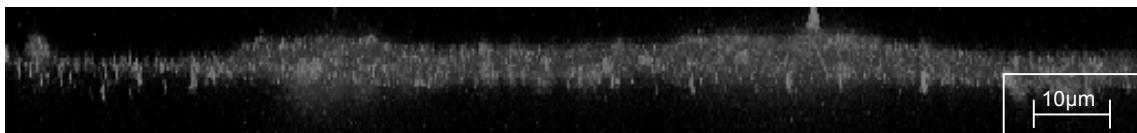


Abb. 63: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 3. Tag

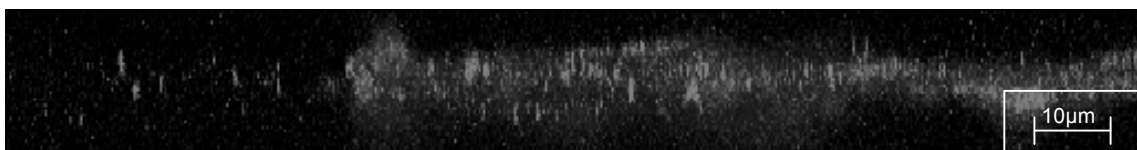


Abb. 64: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 5. Tag

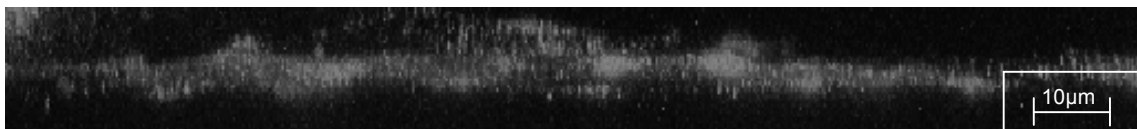


Abb. 65: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 7. Tag

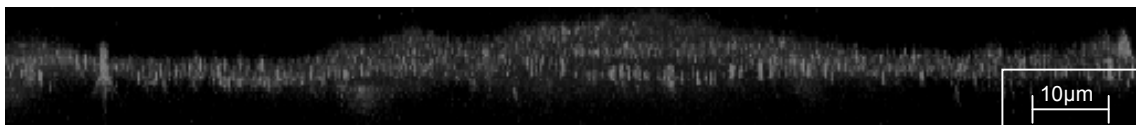


Abb. 66: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 10. Tag

4.2.4. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 4 – ZS4-0,5

Aus dem Säulendiagramm in Abb. 67 geht die BSP-Expression in einem Stack in μm^3 hervor. Die Expression innerhalb der Osteozyten verringert sich beim Probekörper ZS4-0,5 vom 3. zum 7. Versuchstag, um zum 10. Tag bis über das Niveau vom 3. Versuchstag anzusteigen und somit ein Maximum zu erreichen.

Das Diagramm in Abb. 68 gibt eine vergleichende Aussage zum Mittelwert der BSP-Expression aus den 2D-erzeugten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Der Expressionsabfall vom 3. zum 7. Tag ist ebenfalls abzulesen, jedoch erreicht die Expression am 10. Tag nicht das Level vom 3. Tag, ist aber dennoch höher als am 5. und 7. Tag.

In Abb. 69 bis Abb. 72 sind ausgewählte Aufnahmen aus dem zugehörigen Stack abgebildet. Die Größe der Zelleiber nimmt vom 3. Tag (Abb. 69) zum 7. Tag (Abb. 71) zu, um sich am 10. Tag (Abb. 72) wieder zu reduzieren.

Die vertikale Dimension der Stacks, die in Abb. 73 dargestellt ist, ist an allen Untersuchungstagen annähernd gleich.

Bei den 90°-Projektionen ist eine Anordnung von Spikes in den Abb. 74 bis Abb. 77 an allen Versuchstagen über das komplette Untersuchungsareal zu erkennen. Am 3., 5. und 10. Tag sind diese regelmäßig angeordnet. Am 5. Tag ist nur eine mäßige Anordnung zu sehen. Eine Clusterbildung zeigt sich vor allem am 7. und 10. Tag.

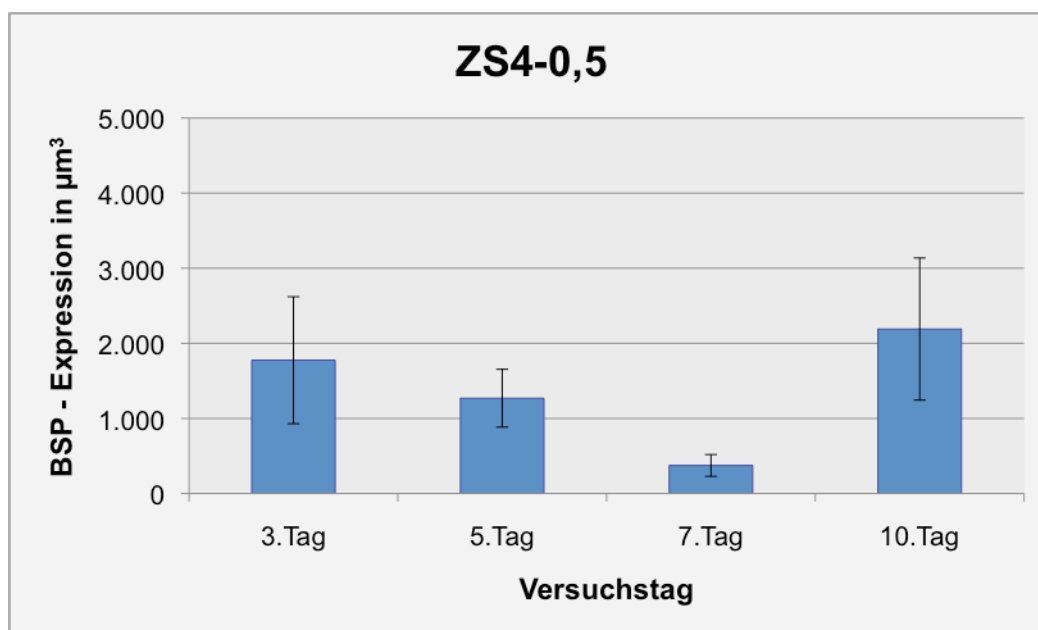


Abb. 67: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

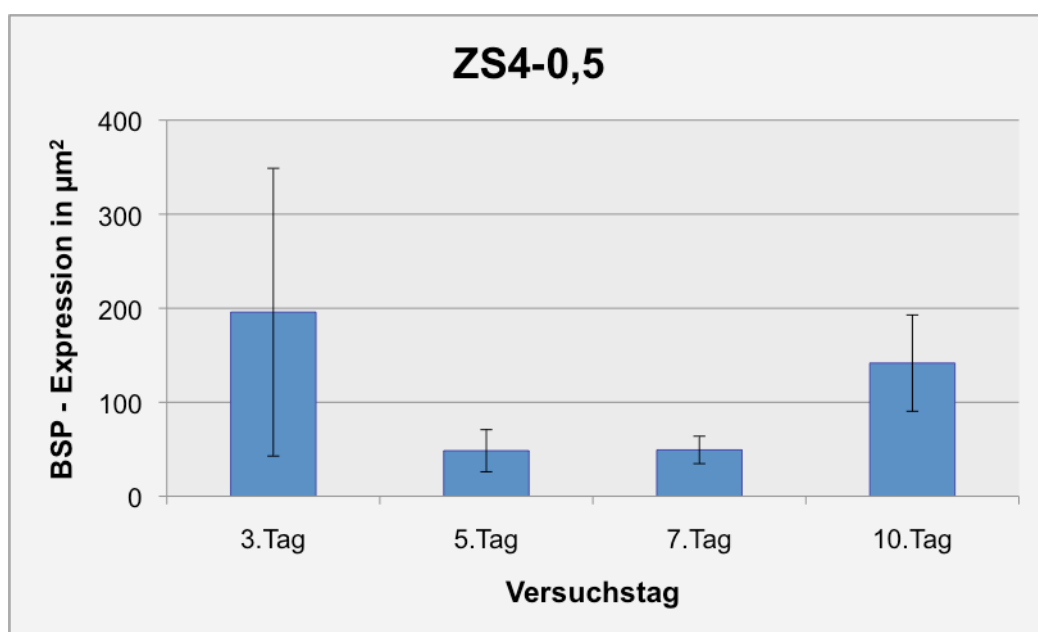


Abb. 68: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.4.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers ZS4-0,5 in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

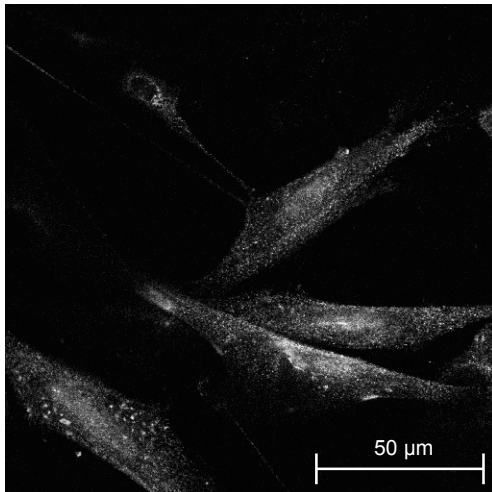


Abb. 69: LSM-Aufsicht des PK 4 – 3. Tag

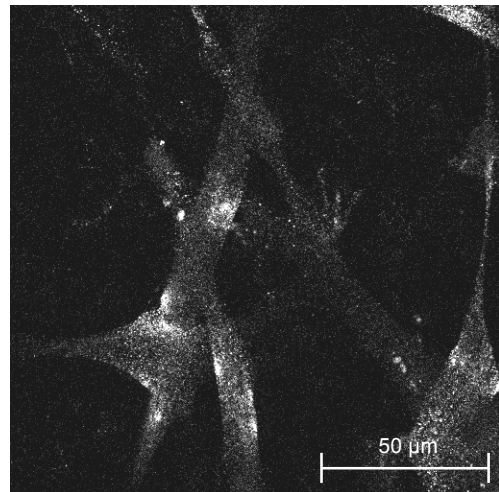


Abb. 70: LSM-Aufsicht des PK 4 – 5. Tag

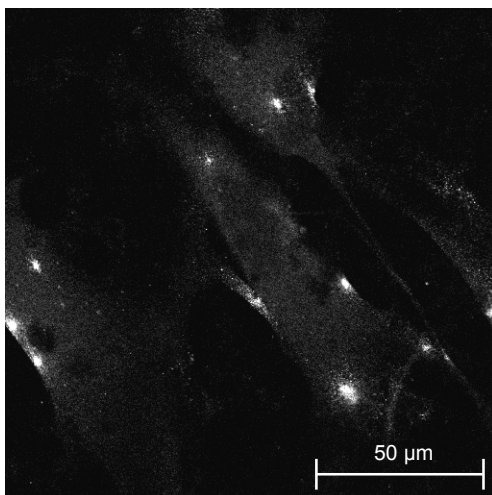


Abb. 71: LSM-Aufsicht des PK 4 – 7. Tag

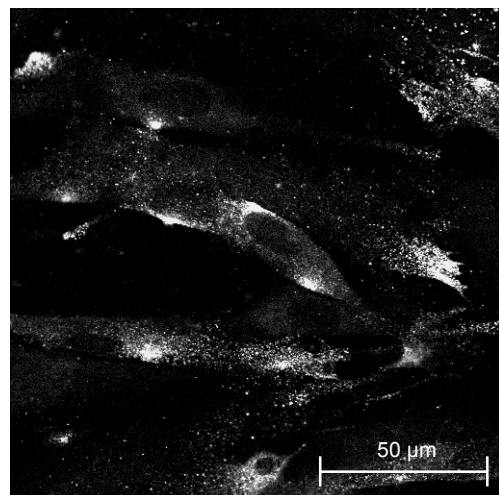


Abb. 72: LSM-Aufsicht des PK 4 – 10. Tag

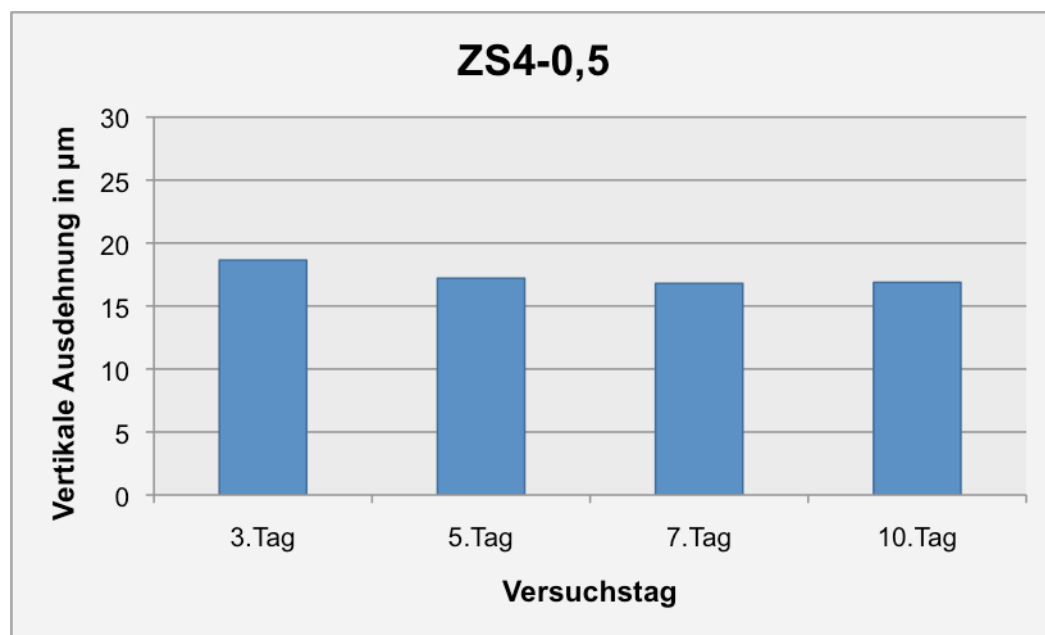


Abb. 73: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZS4-0,5

4.2.4.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion

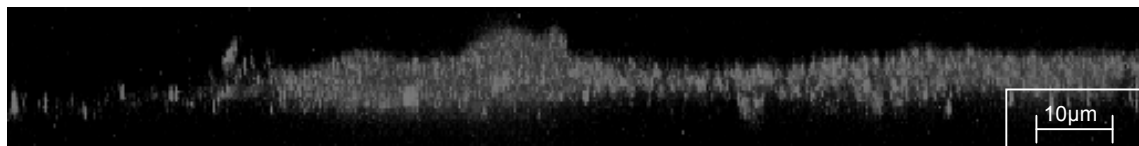


Abb. 74: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 3. Tag

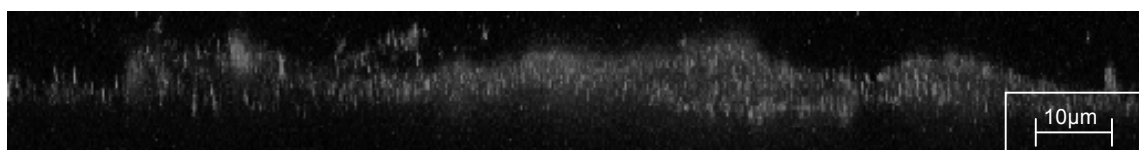


Abb. 75: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 5. Tag

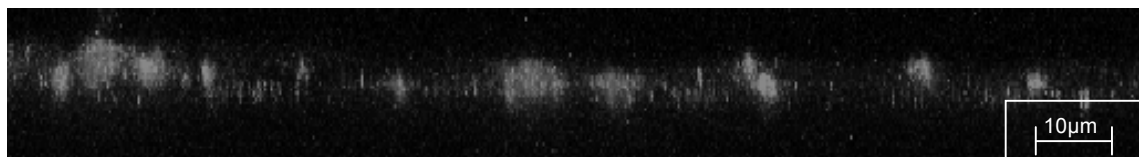


Abb. 76: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 7. Tag



Abb. 77: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 10. Tag

4.2.5. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 5 – ZS4-2

In der grafischen Darstellung der Abb. 78 nimmt die BSP-Expression vom 3. zum 5. Tag deutlich ab, um am 7. Tag anzusteigen, den Wert vom 3. Versuchstag jedoch nicht zu erreichen. Der 10. Tag ist durch einen Abfall der BSP-Expression gekennzeichnet. Die BSP-Expression ist somit am 3. Tag am höchsten.

Als vergleichende Darstellung gilt die Abb. 79, welche die BSP-Expression in der 2D-Darstellung repräsentiert. Das Säulendiagramm mit den Mittelwerten der summierten Projektionen harmonisiert mit denen der 3D-Darstellung.

In der optischen Darstellung (Abb. 80 bis Abb. 83) zeigen sich am 3. und 5. Tag annähernd gleich große Zelleiber. Die Größe der Zellen nimmt am 7. Tag und am 10. Tag ab. Es bilden sich spindelförmige Zellen aus. Die Clusterbildung ist an allen Tagen gering.

Auch die vertikale Ausdehnung der Stacks vom PK 5 ist ungleichmäßig (Abb. 84). Eine deutliche Zunahme ist am 7. Tag gegenüber den anderen Versuchstagen auszumachen.

Dieser Zuwachs ist auch in den Abb. 85 bis Abb. 88 erkennbar. In diesen 90°-Projektionen sind die Spikes an allen Versuchstagen unregelmäßig angeordnet. Die Anzahl nimmt vom 3. zum 5. Tag zu, um am 7. Tag wieder abzunehmen und am 10. Tag wieder deutlich anzusteigen. Cluster sind an dem 5. (Abb. 86) und 10. Versuchstag (Abb. 88) charakteristisch.

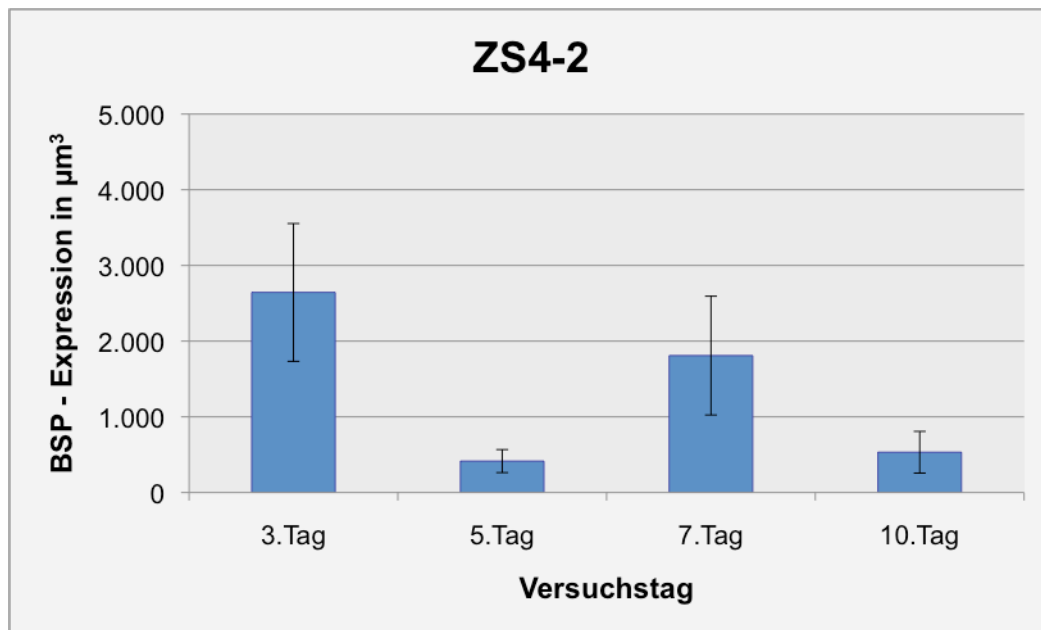


Abb. 78: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

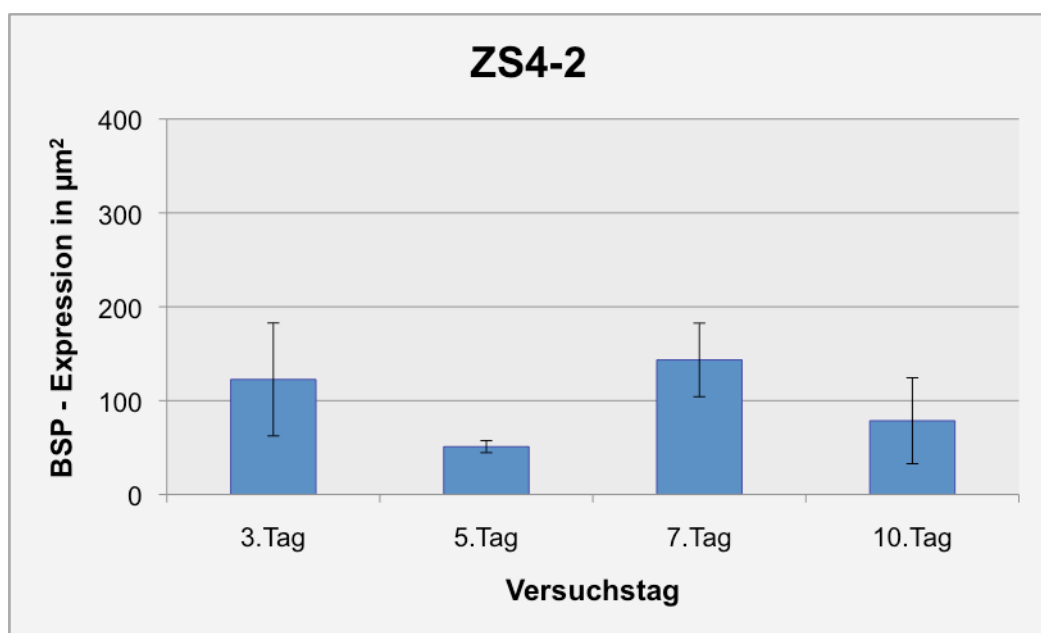


Abb. 79: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.5.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers ZS4-2 in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

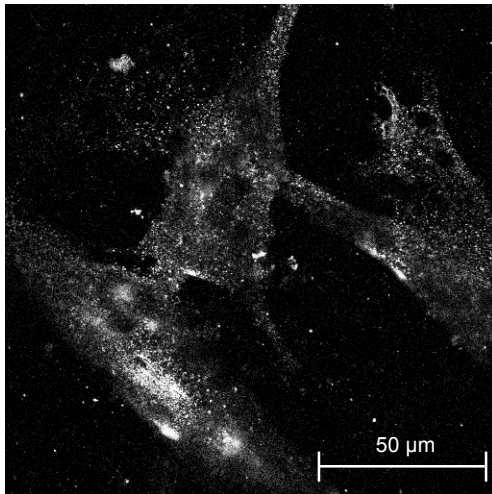


Abb. 80: LSM-Aufsicht des PK 5 – 3. Tag

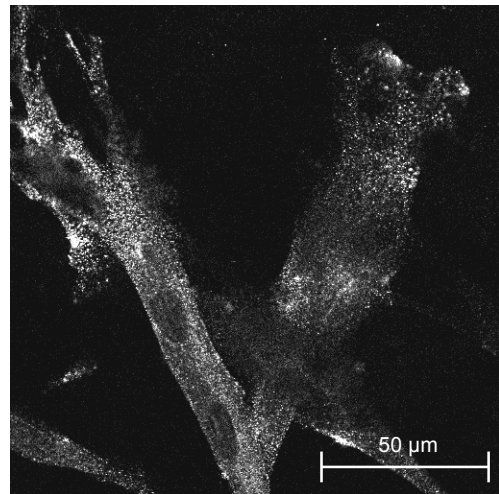


Abb. 81: LSM-Aufsicht des PK 5 – 5. Tag

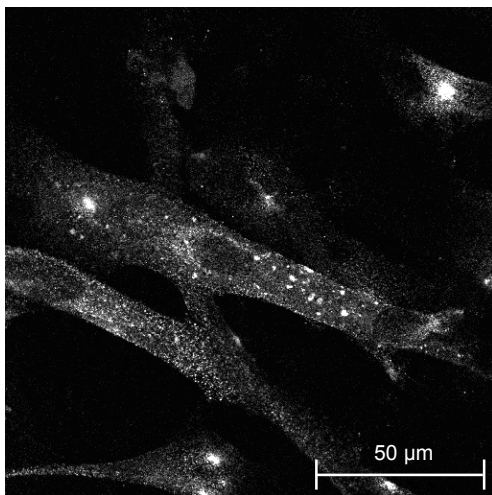


Abb. 82: LSM-Aufsicht des PK 5 – 7. Tag

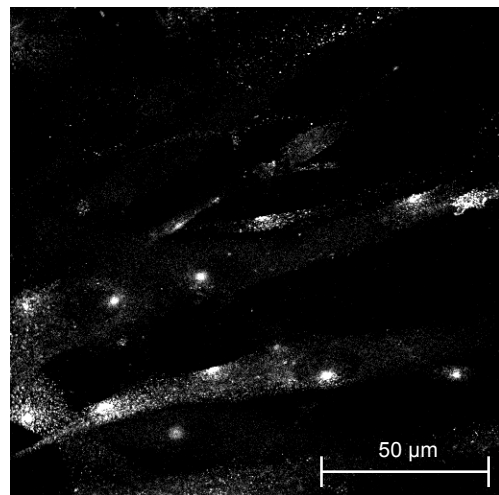


Abb. 83: LSM-Aufsicht des PK 5 – 10. Tag

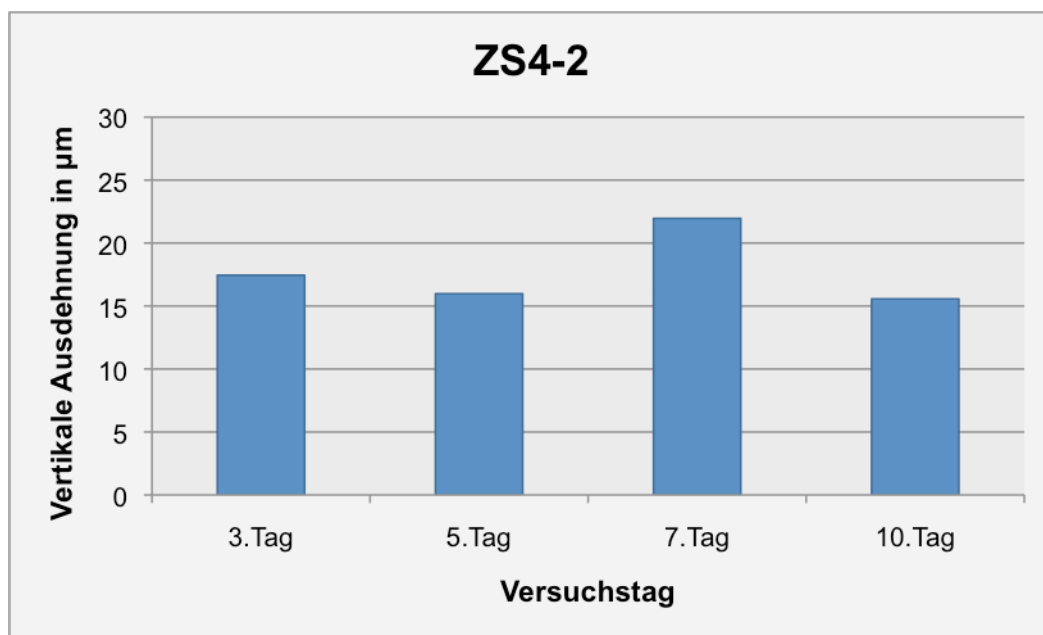


Abb. 84: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZS4-2

4.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion

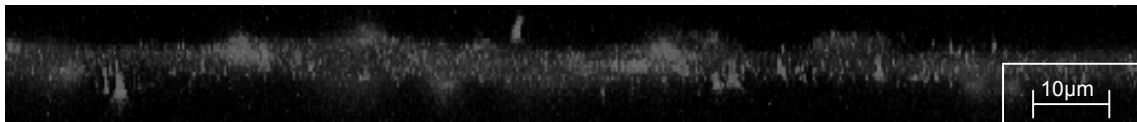


Abb. 85: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 3. Tag



Abb. 86: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 5. Tag

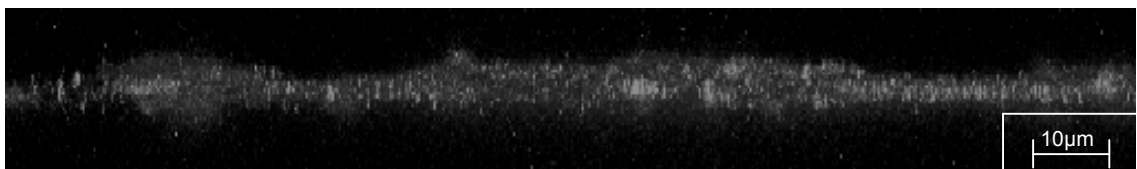


Abb. 87: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 7. Tag

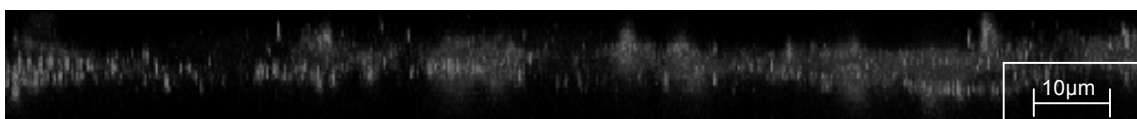


Abb. 88: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 10. Tag

4.2.6. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 6 – Cercon®

Aus dem Diagramm in Abb. 89 geht die mittelwertige BSP-Expression hervor. Diese wird an verschiedenen Versuchstagen innerhalb eines Stacks dargestellt. In der grafischen Darstellung ist ein deutlicher Unterschied der BSP-Expression an den Versuchstagen zu erkennen. Am 3. Tag ist die geringste Expression auszumachen. Am 5. Tag hat sich diese mehr als vervierfacht, um am 7. Tag bis fast auf das Level vom 3. Tag wieder abzunehmen. Am 10. Versuchstag ist eine Verdopplung der BSP-Expression vom 7. Tag zu erfassen.

Als Vergleich wird die Abb. 90 herangezogen. Es zeigt die BSP-Expression in der 2D-Projektion, die mit der 3D-fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme harmoniert.

In den mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 91 bis Abb. 94) sind die spindelförmigen Zellen mit großen Zellkernen erkennbar. Die Anzahl der Zellen nimmt mit Zunahme des Versuchstages zu. Die BSP-Expression ist durch Clusterbildung erkennbar.

Die unterschiedlichen vertikalen Ausdehnungen der Stacks sind in Abb. 95 als Säulendiagramm dargestellt. Die Höhe nimmt vom 3. zum 5. Tag zu, um am 7. Tag dieses Niveau zu halten und sich am 10. Tag wieder zu verringern.

Deutliche Spikes sind an allen Versuchstagen in den 90°-Projektionen (Abb. 96 bis Abb. 99) sichtbar. Die Spikes sind sehr regelmäßig angeordnet, sind aber im Gegensatz zu den anderen Probekörpern sehr kurz. Es ist eine klare Ausbildung der Oberfläche des Probekörpers mit aufgelagerten Zellen erkennbar. Eine Clusterbildung liegt vor allem am 3. (Abb. 96) und am 7. Versuchstag (Abb. 98) vor.

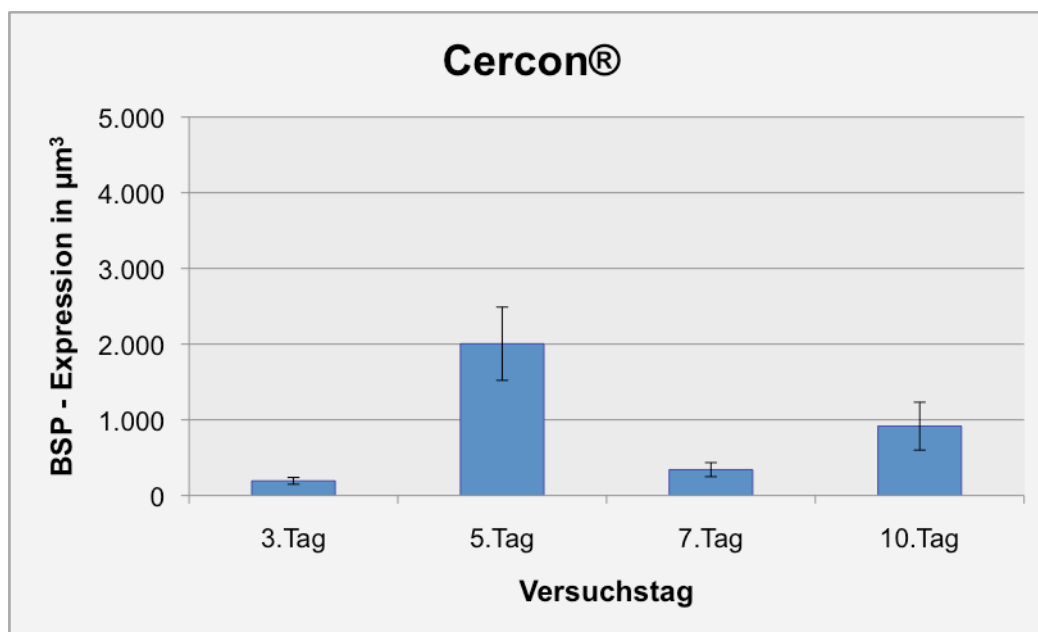


Abb. 89: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

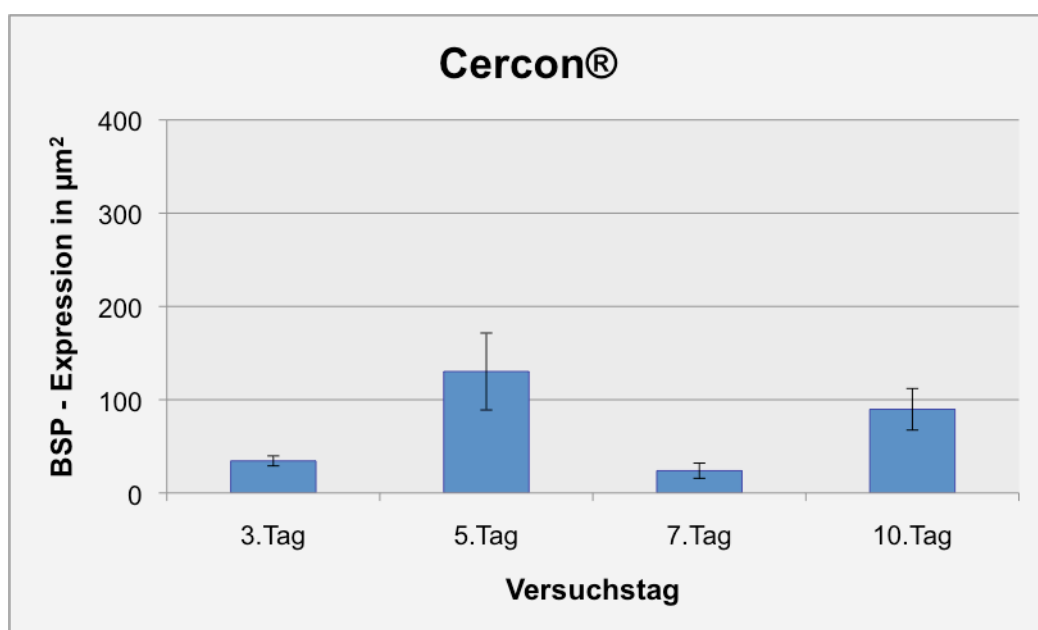


Abb. 90: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.6.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers Cercon® in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

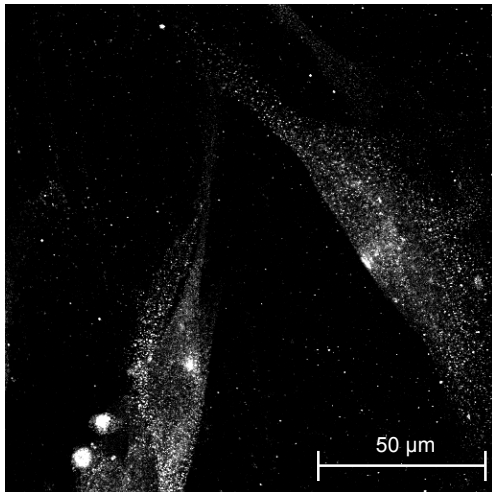


Abb. 91: LSM-Aufsicht des PK 6 – 3. Tag

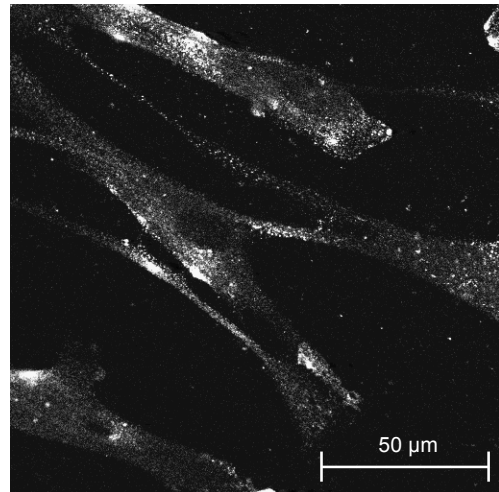


Abb. 92: LSM-Aufsicht des PK 6 – 5. Tag

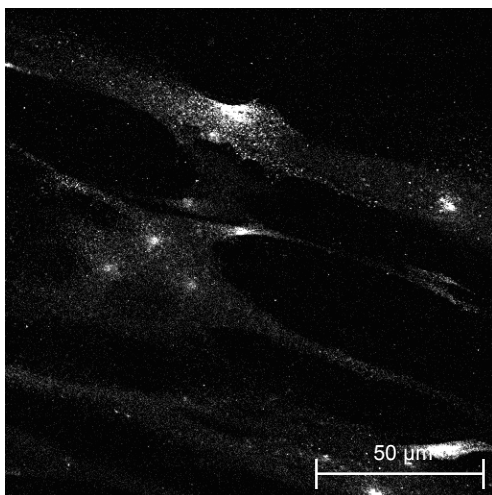


Abb. 93: LSM-Aufsicht des PK 6 – 7. Tag

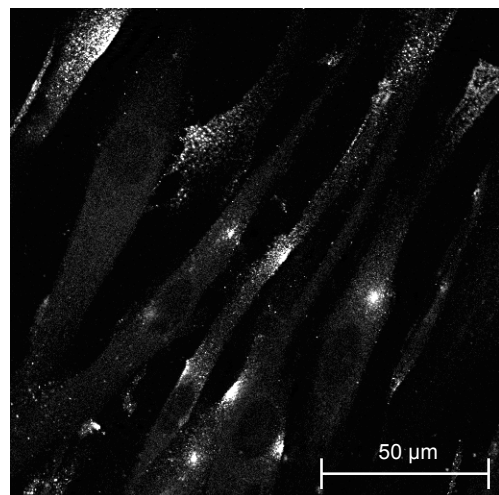


Abb. 94: LSM-Aufsicht des PK 6 – 10. Tag

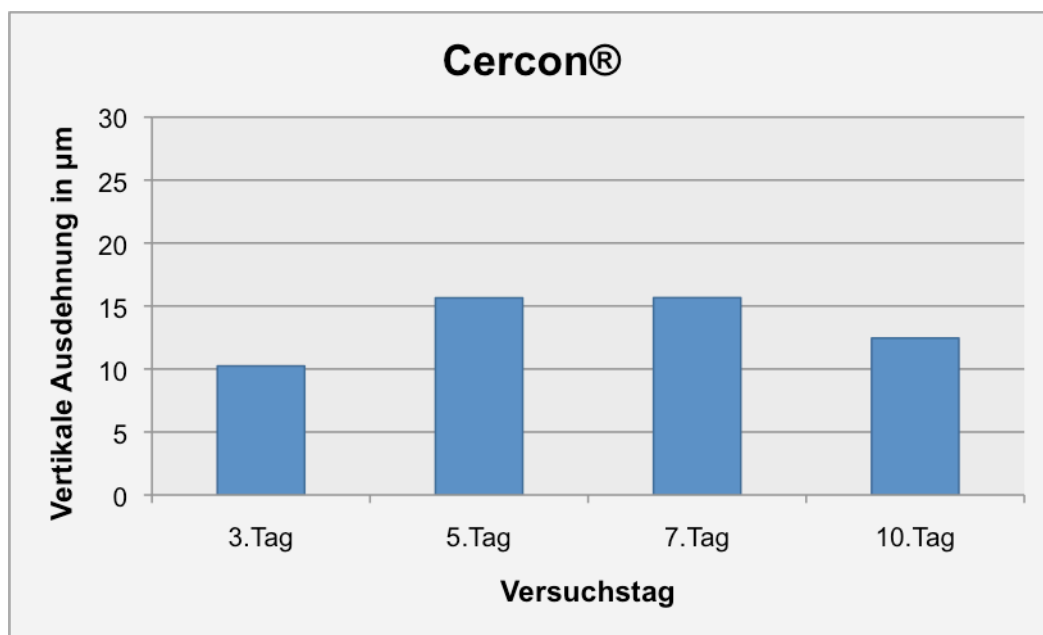


Abb. 95: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers Cercon®

4.2.6.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion



Abb. 96: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 3. Tag

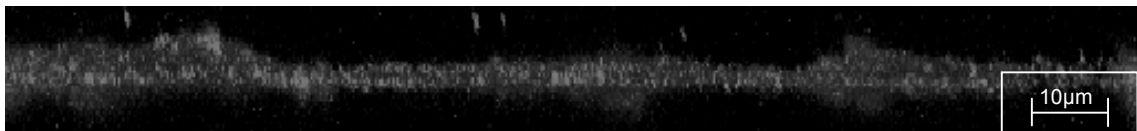


Abb. 97: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 5. Tag

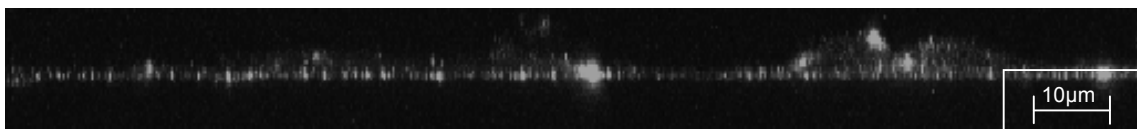


Abb. 98: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 7. Tag

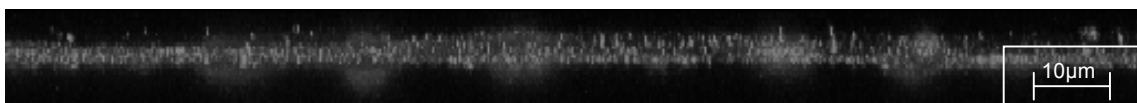


Abb. 99: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 10. Tag

4.2.7. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 7 – TICER®

Die Mittelwerte der BSP-Expressionsvolumina des Probekörpers TICER® sind in Abb. 100 veranschaulicht. Im Säulendiagramm ist eine Abnahme der BSP-Expression vom 3. zum 5. Tag um das Vierfache festzustellen, um zum 7. Tag wieder anzusteigen, das Maß vom 3. Tag jedoch nicht zu erreichen. Am 10. Versuchstag ist eine Abnahme der BSP-Expression erkennbar.

Aus dem Diagramm in Abb. 101 geht die BSP-Expression der 2D-projezierten Aufnahme hervor. Die Expressionsraten der Versuchstage sind mit denen der 3D-Aufnahme konform.

Bei den Singledarstellungen in Abb. 102 bis Abb. 105 ist eine erhöhte BSP-Expression am 3. (Abb. 102) und 7. Tag (Abb. 104) zu verzeichnen. Die Zellen haben einen spindelförmigen Zelleib, in dessen Zytoplasma sich das BSP verteilt. Am 10. Versuchstag haben die Zellen eine rundliche Ausdehnung mit deutlich ausgeprägten Zellkernen (Abb. 105). Eine Zunahme der Anzahl der Osteozyten ist nicht zu erkennen. Die BSP-Cluster sind an allen Tagen klar vorhanden.

Die vertikale Ausdehnung der Stacks geht aus Abb. 106 hervor. Die Ausdehnung in der z-Ebene nimmt vom 3. zum 7. Versuchstag zu und zum 10. Tag wieder ab.

Abb. 107 bis Abb. 110 zeigen die 90°-Projektionen des Probekörpers TICER®. An allen Versuchstagen der 90°-Projektionen sind Spikes erkennbar. Am 3. und 10. Versuchstag sind diese regelmäßig angeordnet. Die Anzahl der Spikes nimmt zum 5. Tag ab, um bis zum 10. Versuchstag deutlich zuzunehmen. Cluster sind vor allem am 3. Tag (Abb. 107) auszumachen.

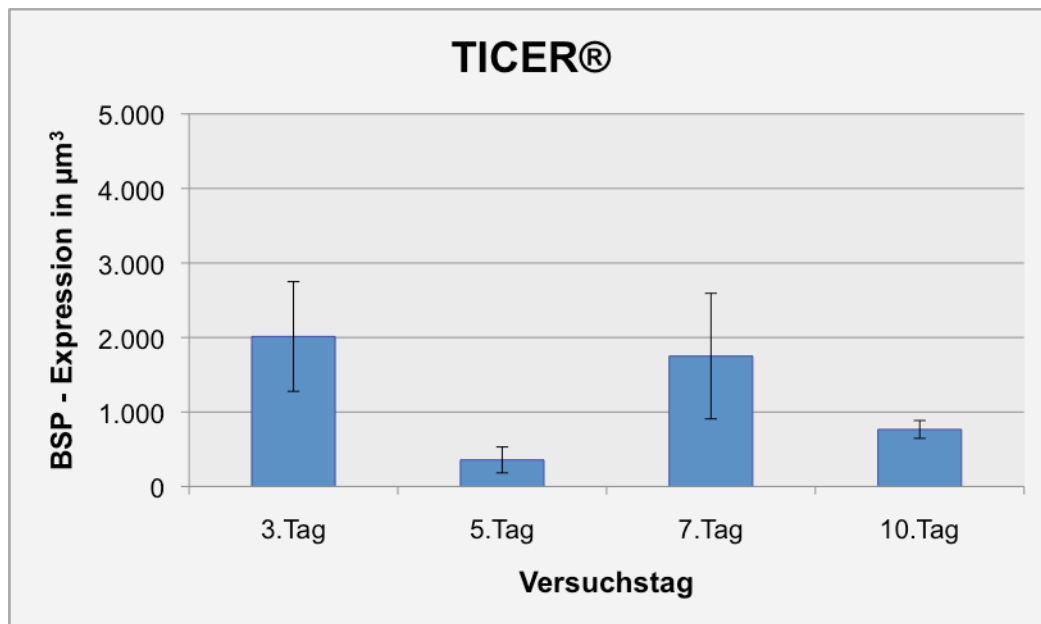


Abb. 100: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

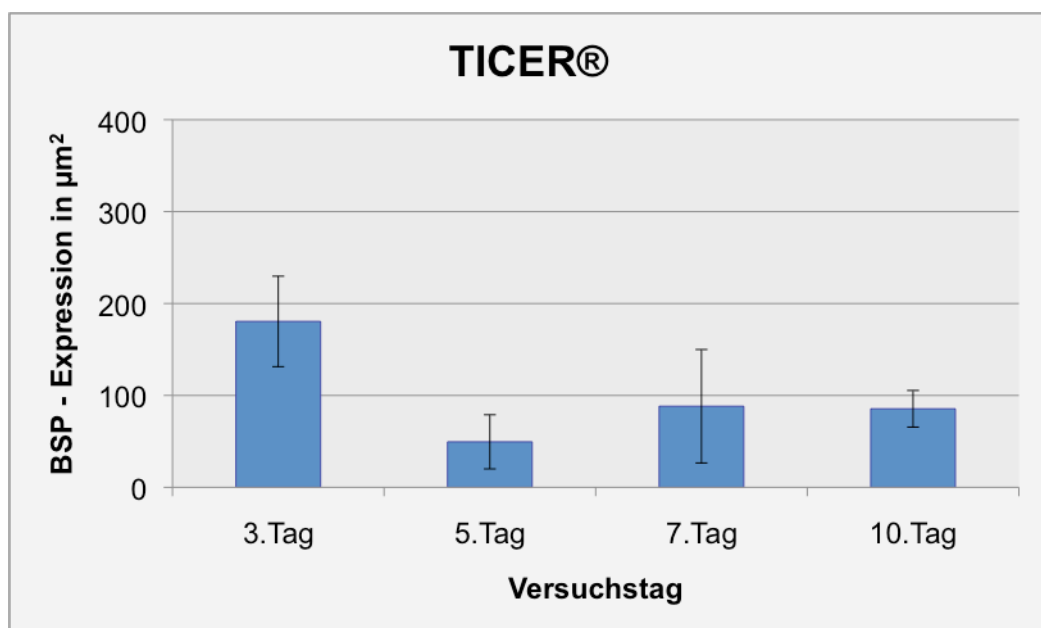


Abb. 101: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.7.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers TICER® in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

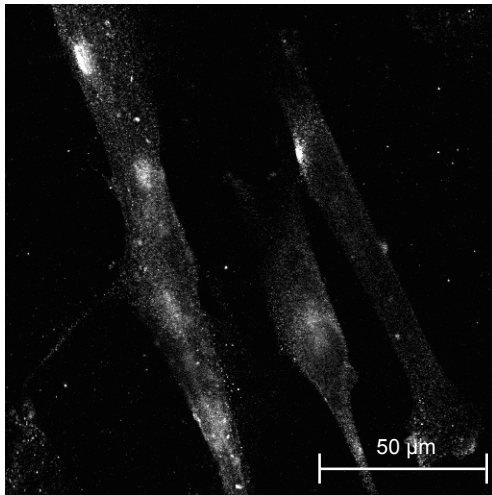


Abb. 102: LSM-Aufsicht des PK 7 – 3. Tag

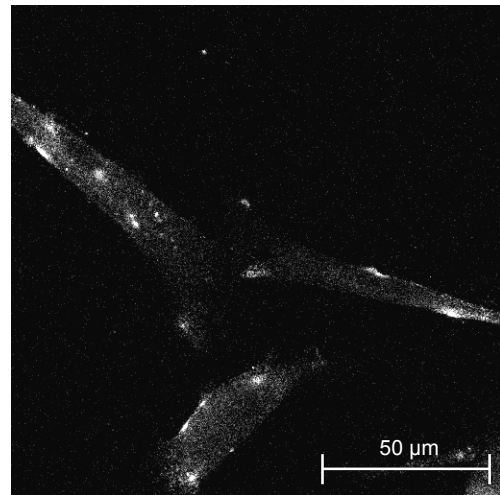


Abb. 103: LSM-Aufsicht des PK 7 – 5. Tag

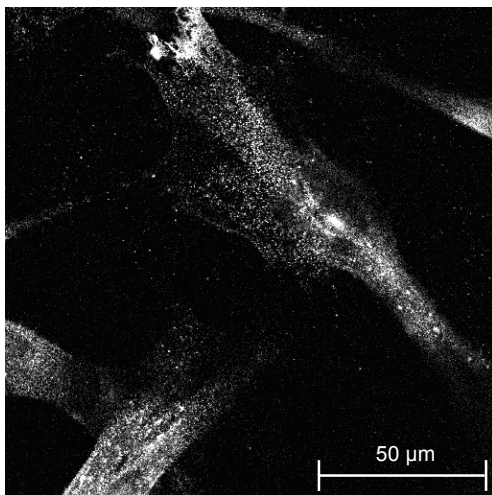


Abb. 104: LSM-Aufsicht des PK 7 – 7. Tag

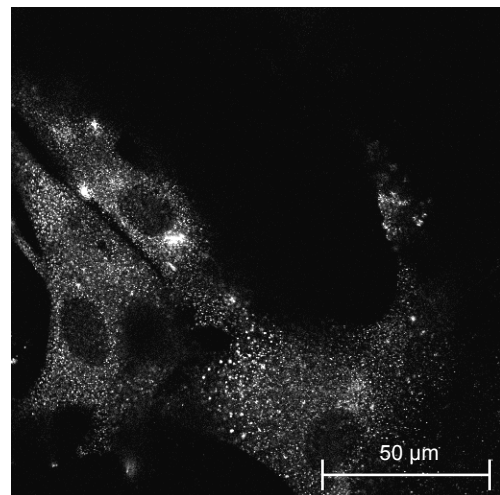


Abb. 105: LSM-Aufsicht des PK 7 – 10. Tag

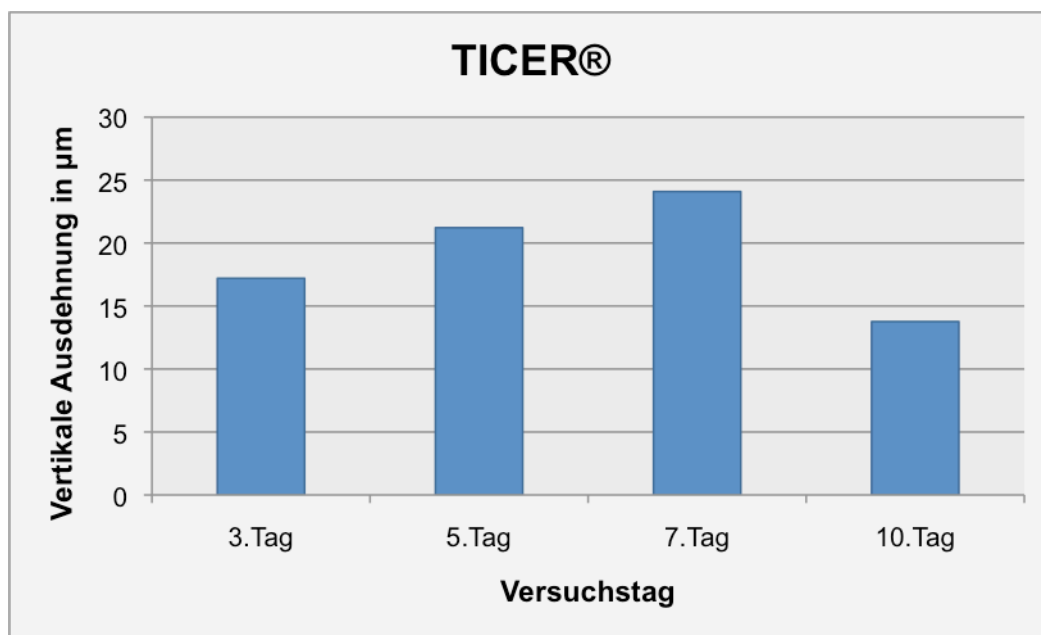


Abb. 106: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers TICER®

4.2.7.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion

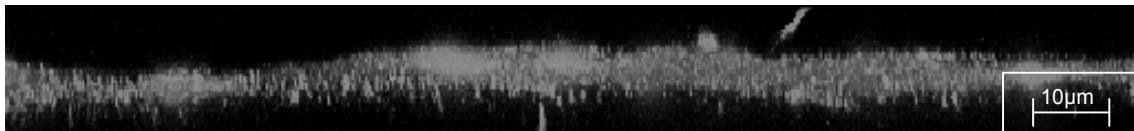


Abb. 107: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 3. Tag

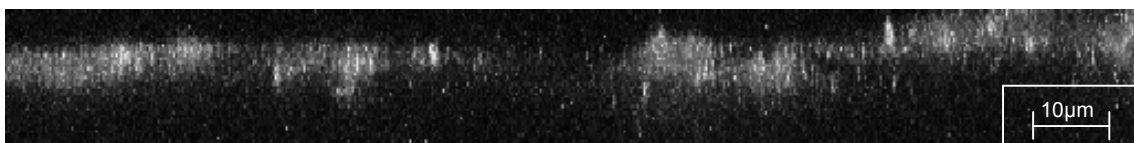


Abb. 108: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 5. Tag

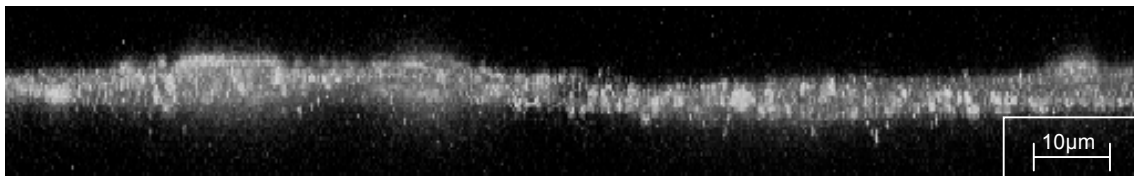


Abb. 109: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 7. Tag



Abb. 110: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 10. Tag

4.2.8. Ergebnisdarstellung des Probekörpers 8 – CPT (Reintitan)

Die BSP-Expression in der 3D-Aufnahme ist in dem Diagramm in Abb. 111 dargestellt. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen ist erkennbar. Die Expression ist am 3. Tag am höchsten, fällt zum 5. Tag ab und reduziert sich nochmals am 7. Tag. Das BSP-Expressionsvolumen steigt am 10. Tag wieder an, erreicht aber nicht das Maximum vom 3. Versuchstag.

Im Säulendiagramm in Abb. 112 ist die BSP-Expression in der 2D-Aufnahme ersichtlich. Der Diagrammverlauf ist, bis auf den 3. Versuchstag, dem Diagrammverlauf aus Abb. 111 analog. Am 3. Tag ist eine annähernd gleiche Expressionsrate wie am 5. und am 7. Versuchstag auszumachen.

Die Abb. 113 bis Abb. 116 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Probekörpers CPT am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag. Optisch sind die kleinen spindelförmigen Zellen am 7. Versuchstag auffällig. Am 10. Tag sind deutlich größere Zelleiber erkennbar. Die Zelleiber am 3. und 5. Tag sind annähernd gleich groß. Die BSP-Expression ist am 5. und 7. Tag vor allem in Clustern vorhanden. Am 3. und am 10. Versuchstag ist die BSP-Expression im Zytoplasma verteilt.

Abb. 117 gibt Informationen über die Ausdehnung der Stacks in der z-Ebene an den unterschiedlichen Versuchstagen. Eine Verringerung ist in der vertikalen Dimension der Stacks bei Zunahme der Versuchstage auszumachen. Eine leichte Reduzierung in der vertikalen Dimension ist vom 3. zum 7. Tag zu verzeichnen, steigt aber am 10. Tag bis über das Niveau des 3. Versuchstages an.

Bei den 90°-Projektionen (vgl. Abb. 118 bis Abb. 121) sind an allen Tagen sehr viele Spikes erkennbar. Diese sind am 3., 5. und 7. Versuchstag regelmäßig angeordnet. Eine Zunahme oder Abnahme der Spikes wird nicht deutlich. Am 5. Tag ist eine Verringerung der BSP-Expression ersichtlich. Cluster sind an allen Tagen dargestellt.

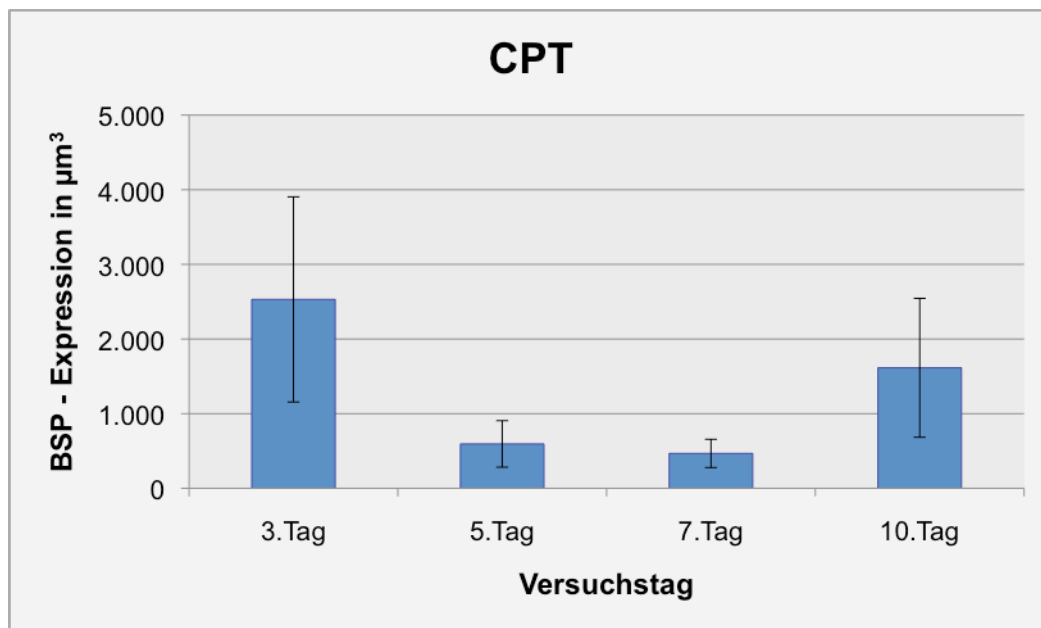


Abb. 111: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack

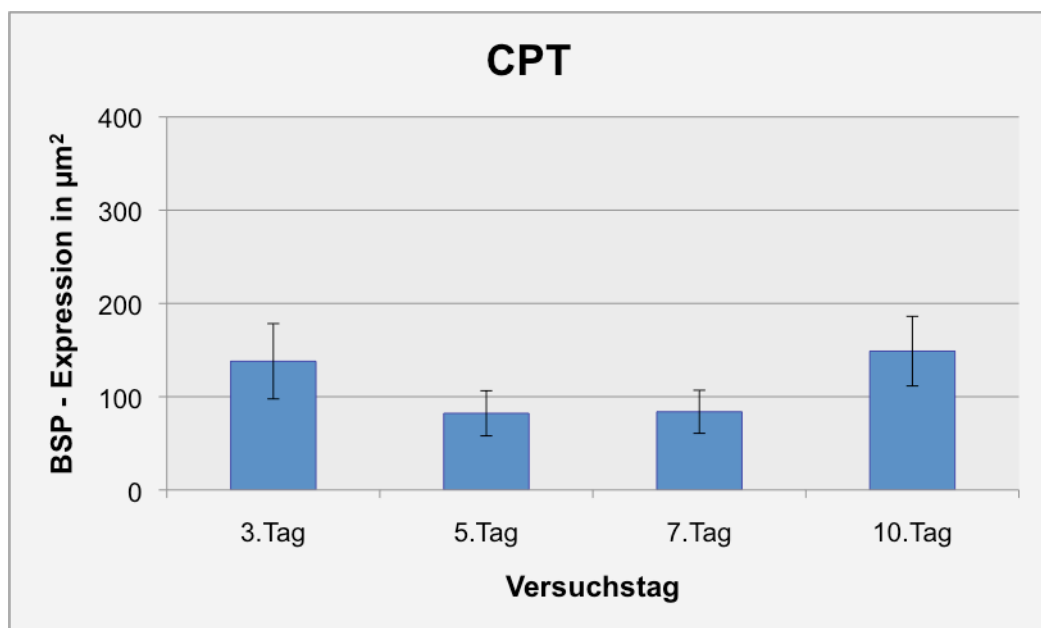


Abb. 112: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion

4.2.8.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression der Osteoblasten des Probekörpers CPT in der Draufsicht

(63-fache Vergrößerung)

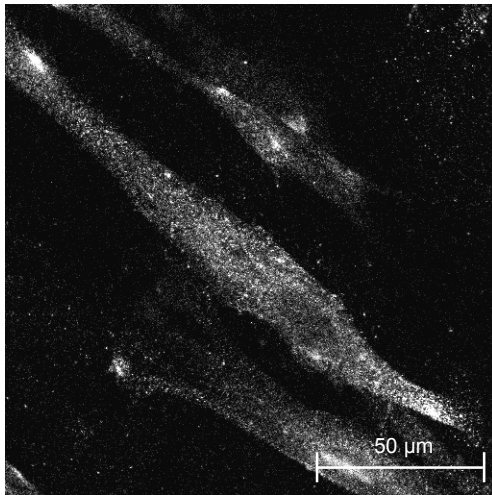


Abb. 113: LSM-Aufsicht des PK 8 – 3. Tag

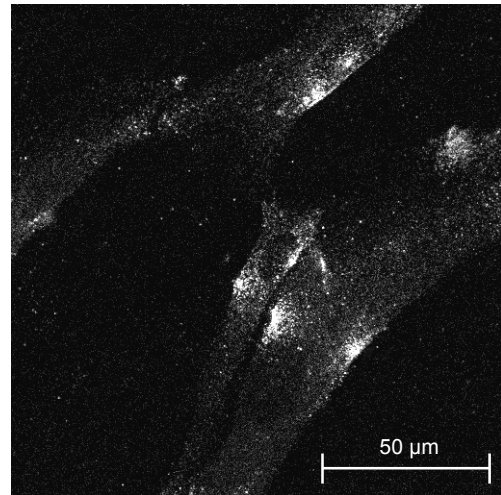


Abb. 114: LSM-Aufsicht des PK 8 – 5. Tag

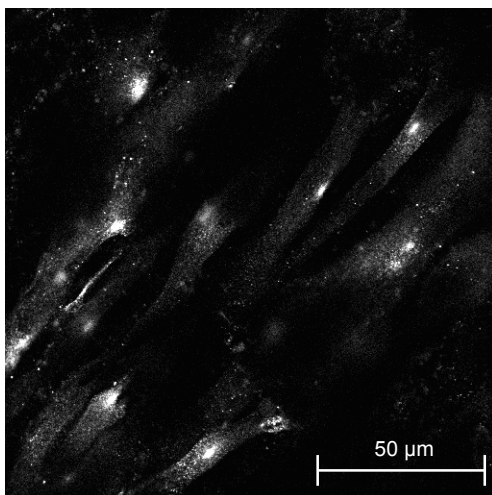


Abb. 115: LSM-Aufsicht des PK 8 – 7. Tag

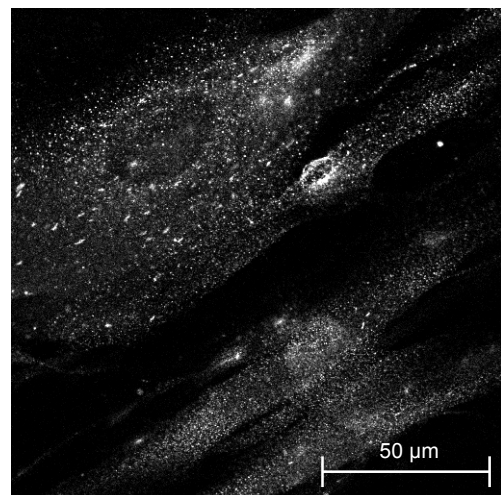


Abb. 116: LSM-Aufsicht des PK 8 – 10. Tag

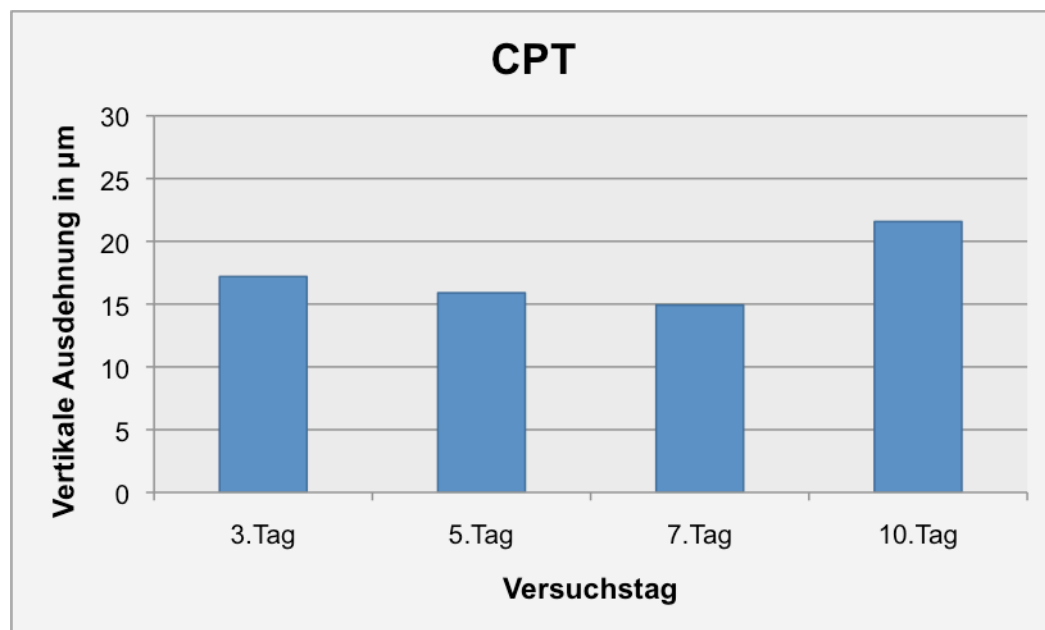


Abb. 117: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers CPT

4.2.8.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der BSP-Expression in der 90°-Projektion



Abb. 118: LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 3. Tag



Abb. 119 LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 5. Tag



Abb. 120: LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 7. Tag

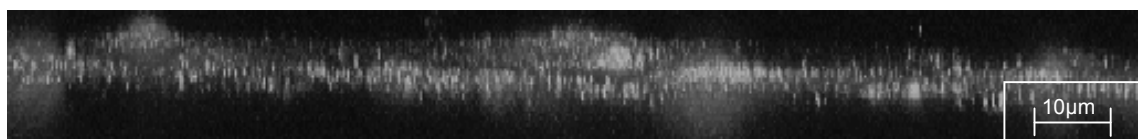


Abb. 121: LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 10. Tag

4.2.9. Darstellung der Leerprobekörper 1-8 als 90°-Projektion

Im Folgenden sind die 90°-Projektionen der Probekörper ohne Knochenzellen dargestellt (Abb. 122 bis Abb. 129). Es soll gezeigt werden, dass eine Proteinabsorption (ZAM-Cy3) auf der Oberfläche des Probekörpers stattfinden kann und die Proteine diffundieren können.

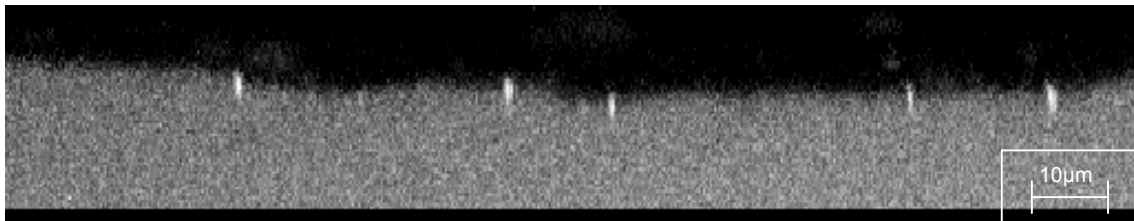


Abb. 122: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 1 – ZSE

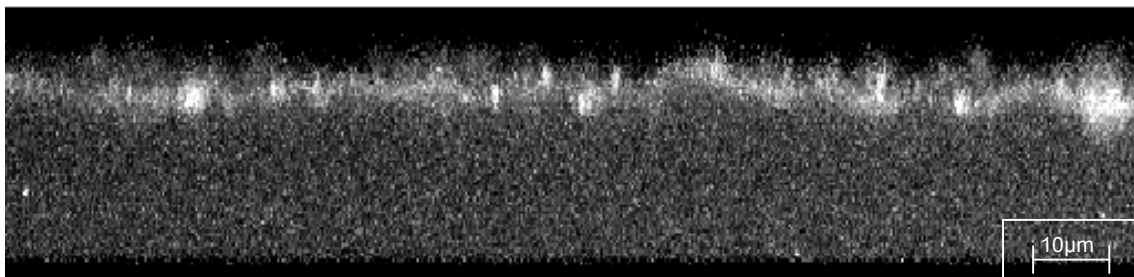


Abb. 123: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 2 – ZSG

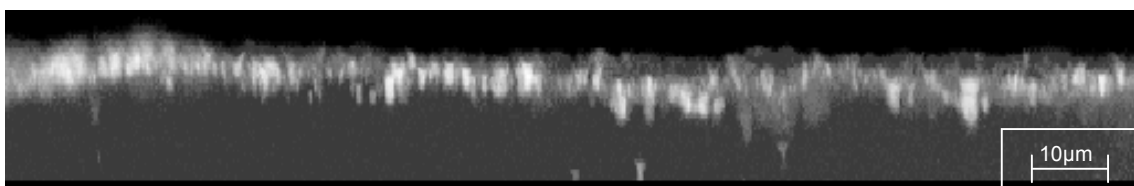


Abb. 124: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 3 – ZSG ½

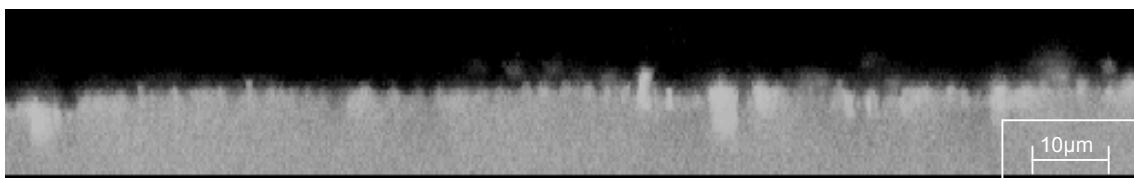


Abb. 125: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 4 – ZS4-0,5

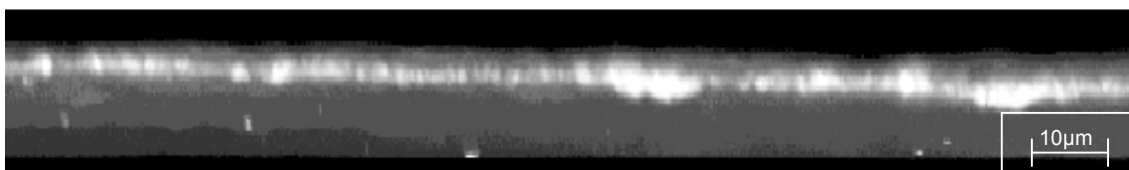


Abb. 126: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 5 – ZS4-2

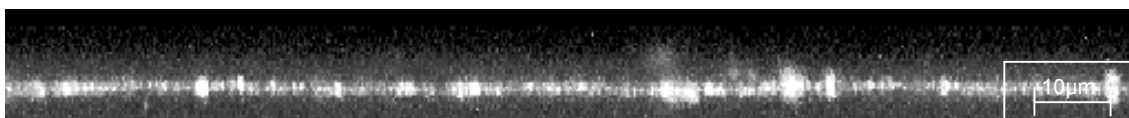


Abb. 127: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 6 – Cercon®

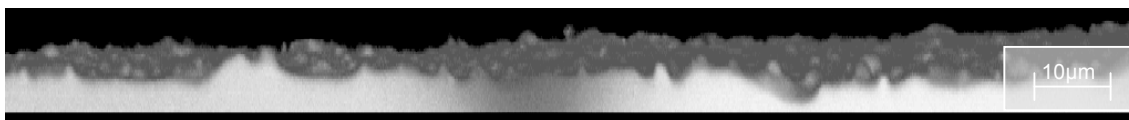


Abb. 128: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 7 – TICER®

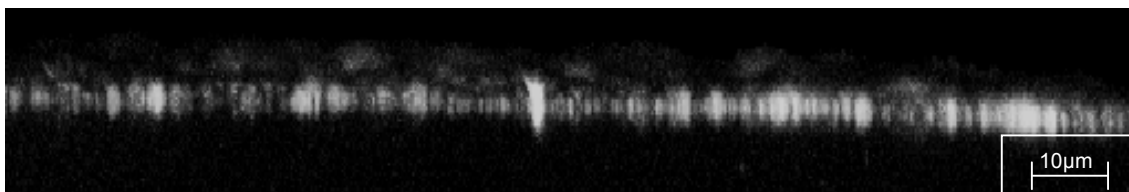


Abb. 129: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 8 – CPT

4.2.10. Zusammenfassung der Ergebnisse der BSP-Expressionen

Als grafische Übersicht ist auf die folgenden Diagramme zu verweisen. Es werden alle Mittelwerte der BSP-exprimierenden Volumina (vgl. Abb. 130) und die Expression bei summierter Projektion (Abb. 131) dargestellt.

Abb. 132 zeigt eine Zusammenstellung der Unterschiede in der vertikalen Dimension bei den verschiedenen Probekörpern an unterschiedlichen Versuchstagen.

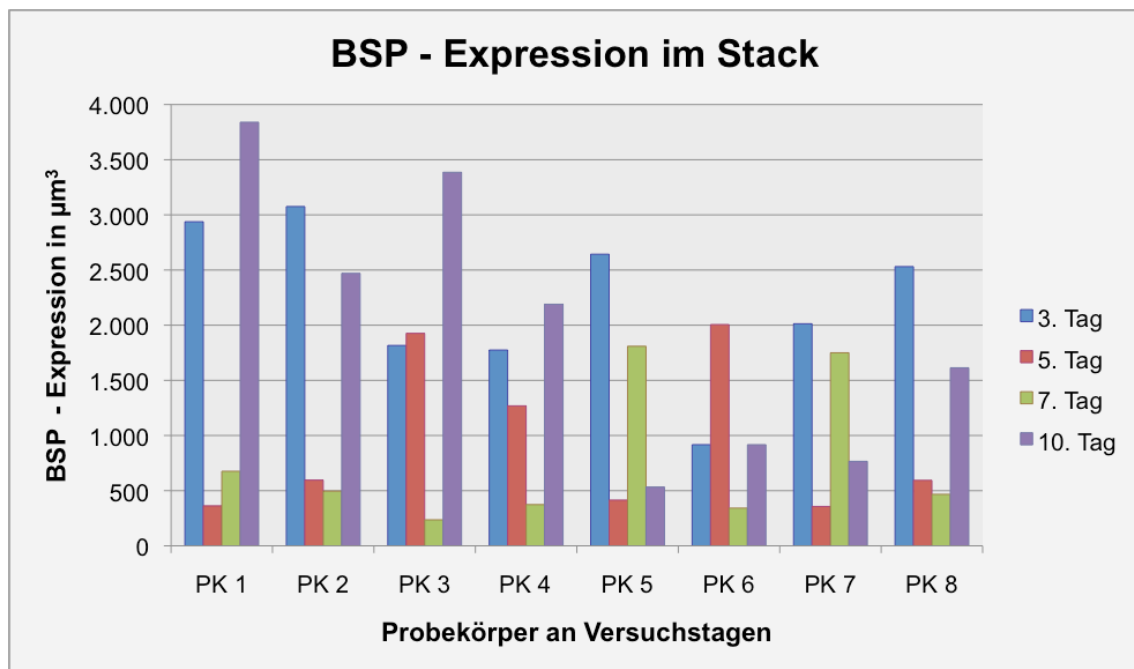


Abb. 130: grafische Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^3 bei verschiedenen Probekörpern und Versuchstagen

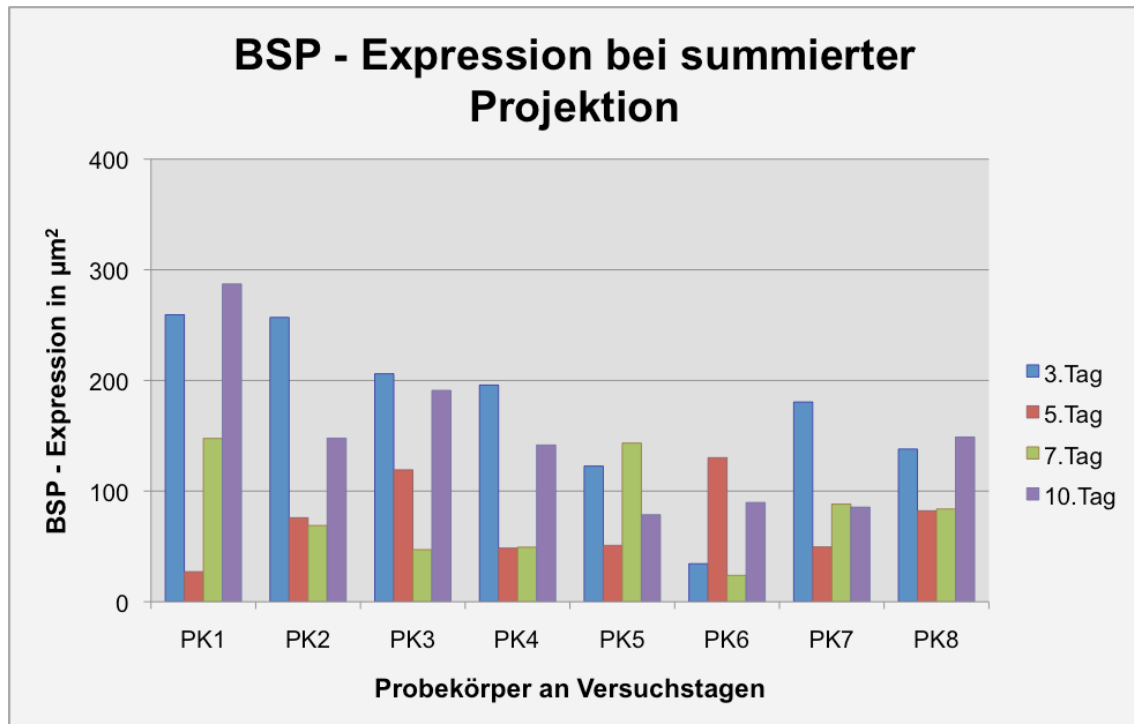


Abb. 131: grafische Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^2 bei verschiedenen Probekörpern und Versuchstagen

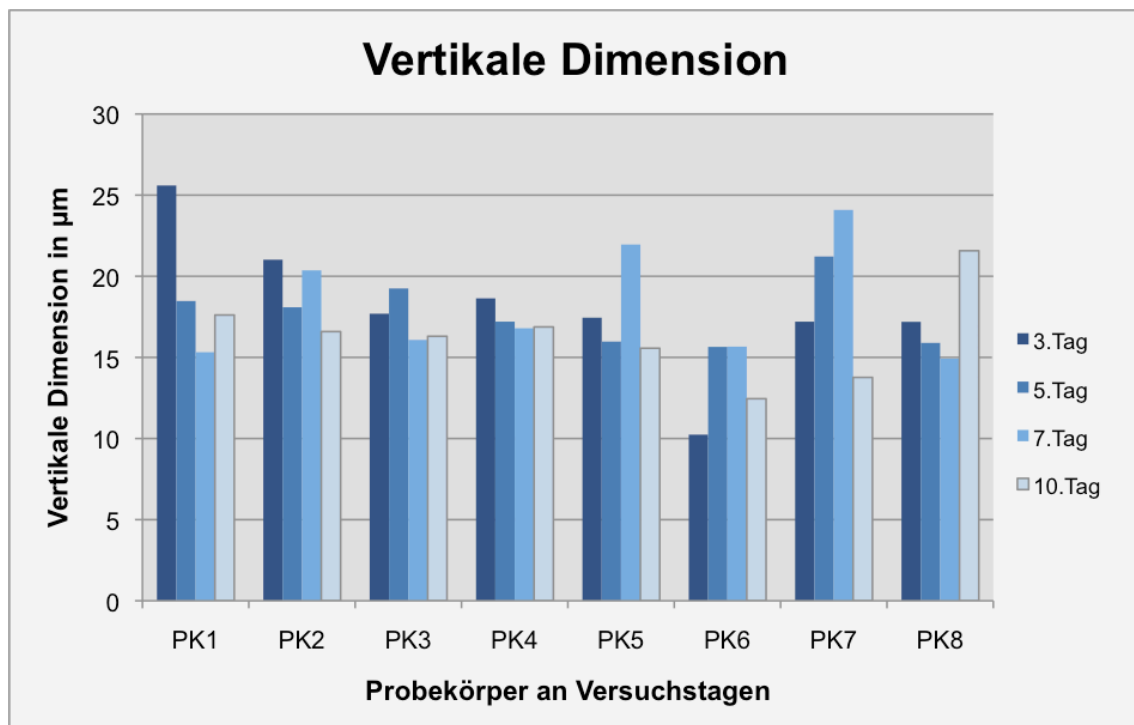


Abb. 132: grafische Darstellung der Mittelwerte der vertikalen Dimension der Stacks bei verschiedenen Probekörpern und Versuchstagen

In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie die Aktivität der Osteoblasten über das Vorhandensein von BSP visuell dargestellt und ausgewertet werden. Eine Übersicht über die Auswertung der vorhandenen BSP-exprimierenden Volumina bei den unterschiedlichen Probekörpern zeigt die nachfolgende Tabelle:

Tab. 4: Mittelwerte der BSP-Expression in μm^3

	PK 1	PK 2	PK 3	PK 4	PK 5	PK 6	PK 7	PK 8
3. Tag	2.937	3.076	1.816	1775	2.644	194	2.013	2.531
5. Tag	242	596	1.926	1.269	415	2.006	357	594
7. Tag	676	496	236	374	1.809	342	1.750	467
10. Tag	3.840	2.470	3.386	2.190	533	917	766	1.614

Tab. 5: Ranking Tabelle – ermittelte Platzierung nach den Mittelwerten der BSP-Expression aus Tab. 4

	PK 1	PK 2	PK 3	PK 4	PK 5	PK 6	PK 7	PK 8
3. Tag	2	1	6	7	3	8	5	4
5. Tag	8	4	2	3	6	1	7	5
7. Tag	3	4	8	6	1	7	2	5
10. Tag	1	3	2	4	8	6	7	5
Summe	14	12	18	20	18	22	21	19
Platzierung	2.	1.	3.	6.	3.	8.	7.	5.

Zum einen sind die Mittelwerte der BSP-Expression der einzelnen Probekörper an den verschiedenen Versuchstagen aufgezeigt (vgl. Tab. 4), zum anderen wird ausgewertet, zu welchem Zeitpunkt welche Oberflächenstruktur die höchste BSP-Expressionsrate aufweist (vgl. Tab. 5). Für die Beurteilung bedeutet dies, dass die Struktur mit dem höchsten BSP-Anteil den Rang 1 erhält, die mit dem Geringsten den letzten möglichen Rang.

Aus dem Vergleich geht hervor (vgl. Tab. 5), dass bei dem Probekörper 2, ZSG, die größte BSP-Expression gemessen werden konnte. Es handelt sich hierbei um eine elektrolytische Beschichtung des Titans in Form von Zirkoniumsulfat, 15-prozentigem Kaliumfluorid und konzentrierter Phosphorsäure. Diesem Probekörper steht das Cercon®, der Probekörper 6, gegenüber. Es kann hier wegen seiner sehr glatten Oberflächenstruktur, nur das geringste mittlere BSP-Expressionsvolumen gemessen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für Aussagen zur Anzahl an Osteoblasten, für die Grauwertanalyse der BSP-Expression und zur Beurteilung der Proliferationsrate und Zellmorphologie die 2D-Fluoreszenz-Mikroskopie mindestens ausreichend ist, wenn nicht der LSM sogar überlegen. Die hier vorliegenden Messwerte der 3D-Mikroskopie sind tendenziell nicht verschieden von den 2D-Projektionen. Für Aussagen zum Diffusions- und Adhäsionsverhalten von Proteinen und Zellen an Implantatoberflächen ist jedoch die 90°-Projektion eines Bildstapels des LSM erforderlich. Der Ansatz, die vertikale Dimension der aufgelagerten Proteine und Osteoblasten auf den Probekörpern näher zu untersuchen und die „Höhe“ der BSP-Expression über der Oberfläche zu betrachten, ist bei weiteren Untersuchungen von hohem Interesse, da hier offenbar erhebliche Unterschiede gefunden werden können.

5. Diskussion

Die Osseointegration, d. h. die funktionelle und strukturelle Verbindung zwischen organisiertem, lebendem Knochen und der Oberfläche des belasteten Implantates (Brånemark, 1977), ist entscheidend für die Optimierung der Materialien für Implantate. Mit Hilfe von histologischen Untersuchungen und der Beurteilung von Implantaten wurde der Knochenbedeckungsindex (Al-Nawas et al., 2006) eingeführt, welcher jedoch nur das Volumen der mineralisierten Hartschubstanz und nicht den Einfluss der Implantatoberfläche auf die Osseointegration erfasst.

Daher ist es Ziel der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops humane Knochenzellen mit der 3-dimensionalen fluoreszenzmikroskopischen Darstellungsmethode hinsichtlich der BSP-Expression zu untersuchen und Rückschlüsse auf die Aktivität der Knochenzellen auf den unterschiedlichen Implantatmaterialien zu ziehen. Außerdem wurde ein Vergleich zwischen der 3D- und der 2D-Fluoreszenzmikroskopie angestellt. Auf Grund der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des BSP können Rückschlüsse auf die Osteoblastenaktivität gezogen und der mitotische Differenzierungsgrad dargestellt werden. Weil das BSP eine sehr hohe Affinität zu Hydroxylapatit und eine Funktion als de-novo Kern von Hydroxylapatit in-vitro besitzt (Chen et al., 1992; Hunter et al., 1993; Yao et al., 1994), ist zu überlegen, ob die Expression des BSP innerhalb der Knochenzellen zeitgleich oder zeitlich versetzt mit der Mineralisierung des Knochens einhergeht. Anderson et al. (2002) konnten zeigen, dass BSP eine ossoinduktive Wirkung zeigt und schon Ross et al. (1993) in einer in-vitro Studie feststellen, dass Unterschiede in der BSP-Konzentration Auswirkungen auf die Knochenresorption haben. 1989 konnten Heinegard et al. (Heinegard et al., 1989) aufzeigen, dass dieses Protein bei der anabolen Phase der Knochenbildung einbezogen ist. Somit ergibt sich, dass es ein visueller Marker ist, um die Zelltätigkeit der Osteoblasten auf den Probekörpern der Implantatoberflächenstrukturen darzustellen.

Das BSP baut sich als Hydroxylapatitkristall in die Osteoblasten ein und gilt auf Grund dessen als Indikator für die Osteoblastenaktivität. Bei einem gesteigerten Knochenstoffwechsel ist BSP erhöht (Ruf, 2001).

Die konventionelle Mikroskopie erlaubt in der Regel nur die Begutachtung der Oberfläche des Präparates, d. h., wenn diese Oberfläche komplett von Zellen bewachsen ist, können nur diese Zellen betrachtet und vermessen werden, die als obere Schicht den Probekörper benetzen. Es ist jedoch bekannt, dass die Rauigkeit der mikrostrukturierten Oberfläche des in den Knochen eingebrachten Fremdkörpers auf das Erreichen der Sekundärstabilität Einfluss hat. Raue Oberflächen erzeugen eine gesteigerte Besetzung von Knochenzellen und damit eine erhöhte Zelladhäsion. Schwartz et al. (1999) zeigten eine erleichterte knöcherne Einscheidung durch regelmäßige Mikroporositäten auf der Implantatoberfläche. Aber auch die Größe der Mikroporen spielt eine wesentliche Rolle beim Wachstum und dem Anheften der Osteoblasten (Zinger et al., 2005).

Die Zelldifferenzierung und Zelladhäsion, aber auch das Wachstum der Zellen, ist unter anderem von der Mikrostruktur der Implantatoberfläche abhängig, wie schon durch Mustafa et al. (2000) und Payer (2010) festgestellt werden konnte. Ebenso wird in einschlägiger Literatur diskutiert, in wie weit eine vergrößerte Oberflächenstruktur mit einer zunächst verzögerten und später verlängerten Zellproliferation in Verbindung zu setzen ist (Cook et al., 1985).

In einem in-vitro Versuch durch Hilbig et al. (2007) konnte herausgefunden werden, dass sich BSP bei glatten Oberflächenstrukturen osseointaktiv auswirkt und bei rauen Oberflächen eine Steigerung der Osseointegration erreicht wird.

Die in dieser Arbeit untersuchten verschiedenen Oberflächenstrukturen (vgl. LSM-Aufnahmen der Leerprobekörper) könnten somit eine unterschiedliche Osteoblastenbesiedlung und Zellproliferationsrate zur Folge haben. Die Zellteilungsraten standen in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht im Focus, weil nach Al-Nawas et al. (2006) eine homogene Knochenbeschichtung weniger wichtig für eine funktionelle Verankerung des Implantates mit dem umgebenden Knochen ist, als die Ausbildung von Trabekelstrukturen, welche für die Entstehung des Knochen-Implantat-Interface relevant sein sollen.

Xiropaidis et al. (2005) stellten in ihrer Untersuchung dar, dass ein geringerer Knochen-Implantat-Kontakt bei den mit Kalziumphosphat beschichteten Implantaten auszumachen ist, als bei den strukturierten, porösen und modifizierten Oberflächen, wie TiUnite®. Das fanden auch Graf et al. (2004) bei den Beschichtungsversuchen an TIGER® und CPT. Es zeigte sich, dass die primär poröse Oberfläche durch die Beschichtung geglättet wird, d. h. dass das flüssige Beschichtungsmaterial die Poren verschließt und dadurch die Zelladhäsion verändert. Die Absorption von Proteinen an der Implantatoberfläche bei Einbringen der Probekörper in ein physiologisches Milieu scheint noch zu wenig Beachtung zu finden. Auch bei den Probekörpern der vorliegenden Arbeit kommt es zu Absorptionsvorgängen an der Oberfläche. Man kann das unterschiedliche Verhalten an den 90°-Projektionen der Leerwerte erkennen. Es überrascht, dass ausgerechnet bei CPT eine diffuse Infiltration des Protein-konjugierten Farbstoffes in die Titanoxidoberfläche von beachtlicher Stärke zu finden ist. Andererseits erklärt diese Prä-Absorption das schnelle Anheften von Osteoblasten, die BSP exprimieren. Auf der Oberfläche des Probekörpers TIGER® markieren die Leerwert-Proteine das poröse Relief. Eine Diffusion in die Tiefe findet nicht statt. Dieses unterschiedliche Absorptionsverhalten der Proteine an der Probekörperoberfläche beeinflusst auch hier die BSP-Expression der angelagerten Osteoblasten. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Oberflächenstruktur des Implantatmaterials und / oder die Beschichtung mit organischen oder anorganischen Materialien die Adhäsion von Osteoblasten beeinflusst, sondern dass auch die Diffusion in die oberflächennahen Schichten des Implantates eine Rolle spielt. Dadurch können die Oberflächeneigenschaften verändert werden.

Vielleicht ist hierin die Ursache für die zwei Osseointegrationswege zu sehen, die in der Einleitung vorgestellt wurden. In diesem Zusammenhang erlaubt die LSM neue Untersuchungsansätze bei der Begutachtung von Implantatmaterialien und zur Optimierung von Beschichtungen. Vermutlich haben versiegelnde Beschichtungen nur einen auf die Porentiefe begrenzten Vorteil beim Eindringen von Zellausläufern, deren Anhaftung durch eben diese Oberflächenbeschichtung begünstigt wurde.

Hier kam es auf den Vergleich der BSP-positiven Volumina auf unterschiedlichen Implantatoberflächen mit den BSP-exprimierenden Flächen in einer mikroskopischen Ebene an. Dieser Vergleich sollte zur Entscheidung beitragen, inwieweit sich der zeit- und materialaufwändige Einsatz des LSM für weitere Untersuchungen lohnt. Die Ergebnisse werden in der zusammenfassenden Darstellung in Abb. 133 und Abb. 134 gezeigt.

In der grafischen Darstellung der Abb. 133, der die Mittelwerte der BSP-Volumina der Stacks in μm^3 zu entnehmen ist, ist erkennbar, dass vom 3. bis zum 7. Versuchstag weniger BSP-exprimierende Strukturen zu verzeichnen sind, als am 10. Versuchstag, wo die Werte wieder ansteigen. Eine Ausnahme bildet hier der Probekörper 6, Cercon®, der die höchste Expression und damit die höchsten Werte am 5. Versuchstag aufzuweisen hat, sowie die Probekörper 5 und 7, ZS4-2 und TICER®. Die grafische Darstellung zeigt am 3. Tag hohe Werte, die zum 5. Tag abfallen, am 7. Tag wieder ansteigen, um am 10. Versuchstag unter das Niveau vom 3. Tag zu fallen. Eine mögliche Ursache könnte darin zu finden sein, dass Osteoblasten Kalzium und Phosphat aufnehmen, welches in der Oberfläche von TICER® zu finden ist, um die Syntheseprodukte an anderer Stelle lokal sezernieren.

Beim Vergleich dieser Aussagen mit der 2D-Mikroskopie, der BSP-Expressionsmessung durch Summierung der Projektion (vgl. Abb. 134), kann ein fast homologer Verlauf der grafischen Darstellungen erfasst werden. Wie schon bei vorherigen Betrachtungen ist PK 6 von dem Kurvenverlauf der anderen Probekörper deutlich abweichend. Es handelt sich hierbei um eine sehr glatte Oberflächenstruktur, an der die Osteozyten nur schwer anhaften können. Die Zellen können sich nur über ihre Flächenhaftung anlagern und nicht überlagern. Die aktiven BSP-sezernierenden Osteoblasten entwickeln sich nach drei Tagen in Osteozyten, die kein BSP mehr exprimieren. Eine Abnahme des BSP ist die Folge. Die Weiterentwicklung des Osteozyten hat eine Größenabnahme dieser zur Folge (Liebich, 2009). Somit ist eine Anlagerung weiterer Osteoblasten wieder möglich.

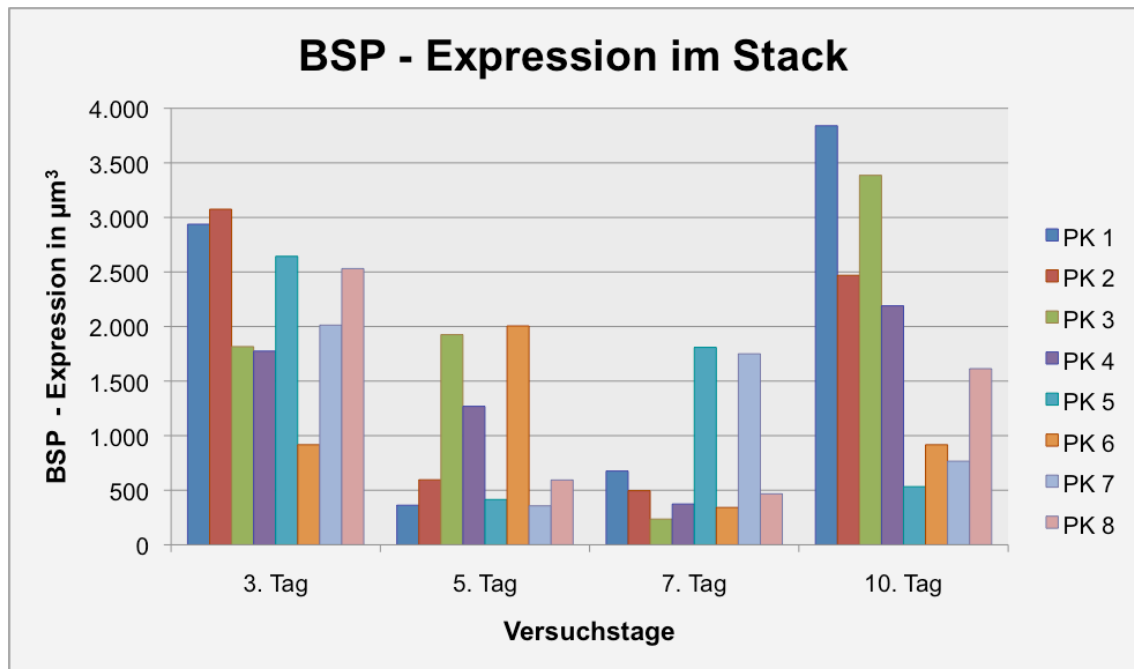


Abb. 133: Zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^3 bei verschiedenen Versuchstagen im Stack

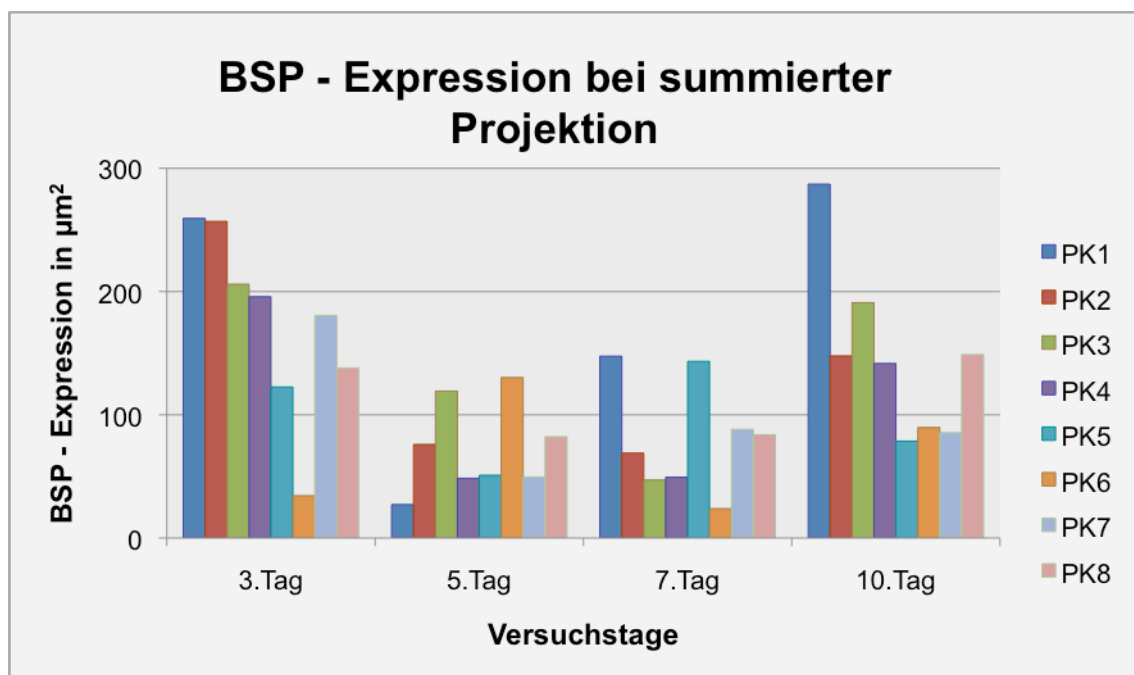


Abb. 134: Zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^2 bei verschiedenen Versuchstagen bei summierender Projektion

Bei der Darstellung der Draufsichten der Probekörper ist eine Konformität der Zellform mit der BSP-Expressionsrate auszumachen. Beim PK 8 (CPT) sind am 7. Versuchstag vor allem spindelförmige Zellen zu erkennen (vgl. Abb. 115),

die BSP-Rate ist gering, inaktive Osteoblasten liegen vor. Ein Ansteigen der BSP-Expressionsrate ist am 10. Tag zu verzeichnen, was bedeutet, dass wieder vermehrt aktive Osteoblasten vorhanden sind oder die vorhandenen Osteoblasten aktiver werden. Es liegen hauptsächlich polygonale Zellen mit einem runden Zellkern vor (vgl. Abb. 116). Beim Cercon® wird dies ebenfalls deutlich (vgl. Abb. 91 bis Abb. 94). Eine geringe BSP-Expression am 3. Tag, mit spindelförmigen Zellen in der Draufsicht, genau wie am 7. Tag und eine erhöhte BSP-Rate am 5. und am 10. Tag mit polygonalen Osteoblasten.

Die bei maschinенbearbeitetem Titan erkennbare Oberflächenstruktur des Leerprobekörpers (vgl. Abb. 26), ermöglicht es den Zellen, sich zur besseren Verankerung mit ihren Dendriten in die Strukturrillen einzulagern, damit eine bessere Haftung an der Oberfläche gewährleistet ist. Die Knochenzellen können die Rillen als Wachstumsgerüst ausnutzen.

Bei den beschichteten Oberflächenstrukturen (PK 1-5), mit einer porösen Oberflächenstruktur (vgl. LSM-Aufnahmen der Leerprobekörper), können ähnliche Übereinstimmungen zwischen dem Volumen der BSP-positiven Strukturen und der Zellmorphologie gefunden werden. Die spindelförmigen Somata gehören wahrscheinlich zu den wachsenden Osteoblasten, die kurz vor der Differenzierung stehen. Ein kleiner runder Kern und ein polygonales Soma sprechen für differenzierte Zellen. Diese Aussagen können nur in den Draufsichtsbildern eruiert werden. Eine Zunahme der vertikalen Ausdehnung ist mit fortschreitenden Versuchstagen auszumachen. Die Zellen haben wegen der rauen Struktur der Oberfläche die Möglichkeit, sich bis in die Poren auszu dehnen, um somit einen Knochen-Implantat-Kontakt zu gewinnen.

Dass der Grund der Abweichung in der Oberflächenstruktur der Probekörper zu suchen ist und deshalb auch unterschiedliche Ergebnisse vorliegen, ist dadurch möglich, dass alle anderen einwirkenden Faktoren, die dies beeinflussen könnten, gleich bleiben. Bei allen Probekörpern wird das Wachstum der Knochenzellen an den gleichen Versuchstagen unterbrochen und eine Versuchsdauer von 10 Tagen angesetzt. Eine längere Versuchsdauer wäre nach Rupietta (2007) nicht sinnvoll, weil es nach dem 10. Tag zur Ausbildung von mehreren Zellschichten auf dem Probekörper kommt und somit einzelne

Zellen nicht mehr voneinander differenziert und untersucht werden können. Außerdem ist die Methode, wie die humanen Knochenzellen auf den Probekörpern kultiviert und mit Hilfe des LSM ausgewertet werden, bei allen vorliegenden Untersuchungsobjekten identisch. Unter Berücksichtigung der identischen Versuchsbedingungen für alle Probekörper, muss davon ausgegangen werden, dass in Hinblick auf den Probekörpern, einzig die Oberflächenstruktur für die beobachtbaren Unterschiede der Versuchsergebnisse ursächlich ist.

Zusammenfassend lässt sich die Empfehlung geben, die Laser-Scanning-Mikroskopie für die Untersuchung ausgewählter experimenteller Implantatoberflächen zu nutzen, weil es durchaus den Vorzug bringt, die Knochenzellen in der 3D-Ausdehnung darzustellen und Abweichungen in einzelnen Schnitten zu erkennen. Die BSP-exprimierenden Volumina und somit auch die Aktivität der Osteoblasten können mikroskopisch genauer aufgenommen und ausgewertet werden. Es ist auch eine exaktere histologische Darstellung der Knochenstruktur möglich. Für die Begutachtung der Absorption von Proteinen an der Oberfläche und eventueller Diffusion in Poren oder kapilläre Strukturen ist die Arbeit am LSM wesentlich effektiver als die Nutzung biochemischer Verfahren. Die 2D-Mikroskopie kann aber durchaus für das Screening von Zellen und Oberflächenstrukturen genutzt werden, um zu einer schnellen Ergebnisübersicht zu gelangen. Damit alle Informationen auch sicher dargestellt werden können, ist es wichtig, dass sich das brauchbare Signal von dem Hintergrundrauschen abhebt. Es ist bekannt, dass dies bei einem hohen Signal-Rausch-Abstand vorliegt. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Probekörper mit dem LSM ist es einfacher die BSP-Expressionsinformation herauszufiltern. Die Ergebnisse sind somit zuverlässiger als bei dem 2D-mikroskopischen Verfahren, bei dem ein kleineres Signal-Rausch-Verhältnis existiert. Das bedeutet, dass sich das Verhältnis des Hintergrundrauschens zu den nutzbaren Informationen verringert.

Bezüglich der untersuchten Probekörper bietet sich PK 2 für eine weiterführende Untersuchung an.

Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. dent.

Volumetrische Untersuchungen zur BSP-Expression humaner männlicher Osteoblasten auf Implantatoberflächen in-vitro mittels Laser-Scanning-Mikroskopie

eingereicht von:

Kristin Bachmann

angefertigt am:

Friedrich-Louis-Hesse-Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und Orale Medizin

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. dent. habil. H.-L. Graf

April 2012

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einsatz der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) für die Beurteilung des Wachstums der Osteoblasten auf experimentellen Implantatoberflächen zu prüfen. Die LSM gestattet die Untersuchung von nichtmetallischen Strukturen in verschiedenen Ebenen, so dass eine 3D-Rekonstruktion und Vermessung möglich wird. Dazu wurden acht Probekörper mit humanen Unterkieferknochenzellen inkubiert und über einen Versuchszeitraum von 10 Tagen analysiert. Die acht Probekörper bestehen aus anodischen Konversionsoberflächen, die aus den Elektrolyten Zirkoniumsulfat, Phosphorsäure und Kaliumfluorid sowie den Kombinationen hergestellt waren. Als Positivstandard dienten TICER® und Cercon® (für die

Präparate mit Zirkonium), als Negativstandard maschinierendes CPT (Reintitan). Nach der Inkubation der Probekörper mit humanen Osteoblasten wurden diese am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein von Strukturen, die Bone-Sialoprotein als wichtigsten Bestandteil der non-kollagenen Proteine von Knochenzellen exprimieren, untersucht. Dazu wurden 3D-Bildstapel von jedem Probekörper und jedem Versuchstag angefertigt und daraus die Volumina der BSP-positiven Strukturen ermittelt. Diese Werte konnten mit dem zweidimensionalen mikroskopischen Verfahren, bei dem nur ein Bild aufgenommen wird, verglichen werden, um Rückschlüsse auf mögliche Differenzen in der Untersuchungs- und Darstellungsmethode zu erhalten.

Im Rahmen der Arbeit sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1. Zeigen die mit dem dreidimensionalen Laser-Scanning-Mikroskop detektierten BSP-Mengen Unterschiede zu den mittels zweidimensionaler Fluoreszenzmikroskopie gemessenen Werten?*

Bei den acht unterschiedlichen Oberflächenstrukturen lassen sich bei dem Vergleich der grafischen Darstellung keine Unterschiede feststellen.

- 2. Was lässt sich aus den eventuell vorhandenen unterschiedlichen Ergebnissen bei diesen verschiedenen Verfahren schlussfolgern?*

Es werden keine deutlichen Unterschiede bei den beiden unterschiedlichen mikroskopischen Verfahren in den Ergebnissen ersichtlich. Mit der 3D-Untersuchungsmethode kann jedoch von einer genaueren Größenangabe, als bei dem 2D-Verfahren, ausgegangen werden, weil von jedem einzelnen Schnitt die BSP-Expression gemessen wurde. Bei dem 2D-mikroskopischen Verfahren wird nur die obere Schicht mit den sich aus den darunterliegenden Schnitten an die Oberfläche projizierten Expressionen gemessen.

3. *Kann festgestellt werden, in welchem Bereich der einzelnen zu untersuchenden Zellen sich die BSP-Mineralisationsfront befindet? Ist die BSP-Expression dabei vor allem intrazellulär oder extrazellulär an der Implantatoberfläche eingelagert?*

Eine Mineralisationsfront lässt sich bis zum 10. Versuchstag bei den vorliegenden Probekörpern nicht finden. Die BSP-Expression findet mit Sicherheit intrazellulär statt. Dies kann man an den kernnahen BSP-positiven Strukturen erkennen. Das BSP wird dann in Richtung Implantatoberfläche ausgeschleust. Ob die Verzuckerung intra- oder extrazellulär vollendet wird, lässt sich hier nicht beantworten.

4. *Sind Unterschiede in der vertikalen Ausdehnung der BSP-Front auf den unterschiedlichen Probekörpern an den verschiedenen Versuchstagen auszumachen?*

Bei der vertikalen Dimension sind Unterschiede bei den unterschiedlichen Versuchstagen und verschiedenen Oberflächenstrukturen auszumachen. Die geringste Projektionshöhe wird bei dem Probekörper 6 (Cercon®) an allen Untersuchungstagen festgestellt. Die elektrolytisch beschichteten Probekörper (Probekörper 1-5 und 7) sind in der z-Ausdehnung nicht deutlich zu unterscheiden.

5. *Stellen sich Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den Implantatoberflächen in Bezug auf die BSP-positiven Strukturen dar?*

Es zeigt sich, dass es keine Korrelation von Oberflächenrauigkeit und der Anheftung von BSP-exprimierenden Osteoblasten gibt. Die markierten Osteoblasten sind in der Anzahl und der Form sehr variabel, scheinen aber mit der BSP-Expression konform zu gehen. Das gesteigerte Vorliegen von spindelförmigen Zellen, spricht für inaktive Osteozyten, die kein BSP sezernieren. Die beiden Probekörper, Probekörper 1 (ZSE) und Probekörper 2 (ZSG), mit den höchsten BSP-Werten, zeigen jedoch eine hohe

Durchlässigkeit für Proteine in tiefere Implantatschichten. Da sich sowohl diese Implantatoberflächen als auch poröse strukturierte Oberflächen in der klinischen Praxis als erfolgreich erweisen, spricht das für zwei Osseointegrationswege.

6. *Welche Aussage über die BSP-Expression lässt sich an den verschiedenen Versuchstagen darstellen? Es ist zu prüfen, ob Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede festgestellt werden können.*

Es sind erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungstagen festzustellen, deren Ursachen vielfältiger Natur sein können, da nur die BSP-positiven Strukturen gemessen werden. Aussagen über die Anzahl der Zellen, z. B. der proliferierenden Zellen, die kein BSP exprimieren, können nicht gemacht werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für Aussagen zur Anzahl an Osteoblasten, für die Grauwertanalyse der BSP-Expression und zur Beurteilung der Proliferationsrate und Zellmorphologie die 2D-Fluoreszenz-Mikroskopie mindestens ausreichend ist, wenn nicht der LSM sogar überlegen. Die hier vorliegenden Messwerte der 3D-Mikroskopie sind tendenziell nicht verschieden von denen der 2D-Projektionen. Für Aussagen zum Diffusions- und Adhäsionsverhalten von Proteinen und Zellen an Implantatoberflächen ist jedoch die 90°-Projektion eines Bildstapels des LSM erforderlich. Der Ansatz, die vertikale Dimension der aufgelagerten Proteine und Osteoblasten auf den Probekörpern näher zu untersuchen und die „Höhe“ der BSP-Expression über der Oberfläche zu betrachten, ist bei weiteren Untersuchungen von hohem Interesse, da hier offenbar erhebliche Unterschiede gefunden werden können.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mechanische Eigenschaften von Titan – Zusammensetzung von Reintitan nach DIN 17850 / ASTM F67 und Ti-6Al-4V nach DIN 17851 und ASTM F136	10
Tab. 2: Physikalische und chemische Eigenschaften von reinem Titan nach DIN 17850 / ASTM F67	12
Tab. 3: Übersicht über die Zusammensetzung der Elektrolytlösungen der Probekörper 1 – 5 und 7 und des Materials der Probekörper 6 und 8.....	30
Tab. 4: Mittelwerte der BSP-Expression in μm^3	79
Tab. 5: Ranking Tabelle – ermittelte Platzierung nach den Mittelwerten der BSP-Expression aus Tab. 4.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Distanz- (A/B) und Kontaktosteogenese (C/D), (Davies, 1998)	3
Abb. 2: Wechselwirkung des BSP mit Zellen	6
Abb. 3: Molekulare Struktur von BSP (Ganss et al., 1999)	8
Abb. 4: Genstruktur von BSP (Ganss et al., 1999).....	8
Abb. 5: Anlagerung der Osteoblasten an die Implantatoberfläche (Stock et al., 2003).....	11
Abb. 6: Phasenumwandlung innerhalb der Keramik bei Spannungsaufbau (alkomdigital-S.à.r.l, 2002).....	14
Abb. 7: Bakterienanhaftung an Titan ((www.dentsply-friadent.com); Gehrke, 2008)	15
Abb. 8: Bakterienanhaftung an Zirkoniumdioxid ((www.dentsply-friadent.com); Gehrke, 2008)	15
Abb. 9: REM-Aufnahme der Implantatoberfläche Ticer® (Graf et al., 2008)	17
Abb. 10: REM-Aufnahme der Oberfläche TiUnite® (Graf et al., 2009).....	19
Abb. 11: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZSE	25
Abb. 12: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZSE – leicht gedreht; ohne Zellen	25
Abb. 13: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG.....	25
Abb. 14: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG – leicht gedreht; ohne Zellen.....	25
Abb. 15: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG ½.....	26
Abb. 16: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZSG ½ – leicht gedreht; ohne Zellen.....	26
Abb. 17: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-0,5	26
Abb. 18: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-0,5 – leicht gedreht; ohne Zellen	26
Abb. 19: REM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-2	27
Abb. 20: LSM-Aufnahme der Oberfläche von ZS4-2 – leicht gedreht; ohne Zellen	27
Abb. 21: REM-Aufnahme der Oberfläche von Cercon®.....	27
Abb. 22: LSM-Aufnahme der Oberfläche von Cercon® – leicht gedreht; ohne Zellen	27
Abb. 23: REM-Aufnahme der Oberfläche von Ticer®	28
Abb. 24: LSM-Aufnahme der Oberfläche von Ticer® – leicht gedreht; ohne Zellen.....	28
Abb. 25: REM-Aufnahme der Oberfläche von CPT	29
Abb. 26: LSM-Aufnahme der Oberfläche von CPT – leicht gedreht; ohne Zellen	29
Abb. 27: Arbeitsfoto der Zellanzucht, 200-fache Vergrößerung, inverses Mikroskop	31
Abb. 28: Chamber Slide mit Probekörpern	33
Abb. 29: Strahlengang in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, 2002).....	36
Abb. 30: Abstrakt dargestellter Probekörper mit fünf ausgewählten Bereichen zur fluoreszenz- mikroskopischen Aufnahme als Stack	38
Abb. 31: Bildarchitektur – Abstrakte Darstellung eines Stacks mit Osteozyten als rotes Element	38
Abb. 32: Beispiel für eine LSM-Aufnahme aus einem Stack eines Probekörpers mit dem LSM 40	

Abb. 33: Beispiel für eine 90°-Projektion eines Probekörpers	40
Abb. 34: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^3]$ an den Versuchstagen im Stack	44
Abb. 35: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^2]$ an den Versuchstagen bei summierter Projektion	44
Abb. 36: LSM-Aufsicht des PK 1 – 3. Tag	45
Abb. 37: LSM-Aufsicht des PK 1 – 5. Tag	45
Abb. 38: LSM-Aufsicht des PK 1 – 7. Tag	45
Abb. 39: LSM-Aufsicht des PK 1 – 10. Tag	45
Abb. 40: $\bar{x} [\mu\text{m}]$ der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZSE	46
Abb. 41: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 3. Tag	46
Abb. 42: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 5. Tag	46
Abb. 43: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 7. Tag	46
Abb. 44: LSM-90°-Projektion des PK 1 (ZSE) – 10. Tag	46
Abb. 45: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^3]$ an den Versuchstagen im Stack	48
Abb. 46: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^2]$ an den Versuchstagen bei summierter Projektion	48
Abb. 47: LSM-Aufsicht des PK 2 – 3. Tag	49
Abb. 48: LSM-Aufsicht des PK 2 – 5. Tag	49
Abb. 49: LSM-Aufsicht des PK 2 – 7. Tag	49
Abb. 50: LSM-Aufsicht des PK 2 – 10. Tag	49
Abb. 51: $\bar{x} [\mu\text{m}]$ der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZSG	50
Abb. 52: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 3. Tag	50
Abb. 53: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 5. Tag	50
Abb. 54: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 7. Tag	50
Abb. 55: LSM-90°-Projektion des PK 2 (ZSG) – 10. Tag	50
Abb. 56: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^3]$ an den Versuchstagen im Stack	52
Abb. 57: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^2]$ an den Versuchstagen bei summierter Projektion	52
Abb. 58: LSM-Aufsicht des PK 3 – 3. Tag	53
Abb. 59: LSM-Aufsicht des PK 3 – 5. Tag	53
Abb. 60: LSM-Aufsicht des PK 3 – 7. Tag	53
Abb. 61: LSM-Aufsicht des PK 3 – 10. Tag	53
Abb. 62: $\bar{x} [\mu\text{m}]$ der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZSG $\frac{1}{2}$	54
Abb. 63: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 3. Tag	54
Abb. 64: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 5. Tag	54
Abb. 65: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 7. Tag	54
Abb. 66: LSM-90°-Projektion des PK 3 (ZSG $\frac{1}{2}$) – 10. Tag	54
Abb. 67: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^3]$ an den Versuchstagen im Stack	56
Abb. 68: BSP-Expression $\bar{x} \pm s [\mu\text{m}^2]$ an den Versuchstagen bei summierter Projektion	56
Abb. 69: LSM-Aufsicht des PK 4 – 3. Tag	57
Abb. 70: LSM-Aufsicht des PK 4 – 5. Tag	57
Abb. 71: LSM-Aufsicht des PK 4 – 7. Tag	57

Abb. 72: LSM-Aufsicht des PK 4 – 10. Tag	57
Abb. 73: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZS4-0,5	58
Abb. 74: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 3. Tag	58
Abb. 75: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 5. Tag	58
Abb. 76: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 7. Tag	58
Abb. 77: LSM-90°-Projektion des PK 4 (ZS4-0,5) – 10. Tag	58
Abb. 78: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack	60
Abb. 79: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion	60
Abb. 80: LSM-Aufsicht des PK 5 – 3. Tag	61
Abb. 81: LSM-Aufsicht des PK 5 – 5. Tag	61
Abb. 82: LSM-Aufsicht des PK 5 – 7. Tag	61
Abb. 83: LSM-Aufsicht des PK 5 – 10. Tag	61
Abb. 84: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers ZS4-2	62
Abb. 85: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 3. Tag	62
Abb. 86: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 5. Tag	62
Abb. 87: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 7. Tag	62
Abb. 88: LSM-90°-Projektion des PK 5 (ZS4-2) – 10. Tag	62
Abb. 89: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack	64
Abb. 90: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion	64
Abb. 91: LSM-Aufsicht des PK 6 – 3. Tag	65
Abb. 92: LSM-Aufsicht des PK 6 – 5. Tag	65
Abb. 93: LSM-Aufsicht des PK 6 – 7. Tag	65
Abb. 94: LSM-Aufsicht des PK 6 – 10. Tag	65
Abb. 95: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers Cercon®	66
Abb. 96: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 3. Tag	66
Abb. 97: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 5. Tag	66
Abb. 98: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 7. Tag	66
Abb. 99: LSM-90°-Projektion des PK 6 (Cercon®) – 10. Tag	66
Abb. 100: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack	68
Abb. 101: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion	68
Abb. 102: LSM-Aufsicht des PK 7 – 3. Tag	69
Abb. 103: LSM-Aufsicht des PK 7 – 5. Tag	69
Abb. 104: LSM-Aufsicht des PK 7 – 7. Tag	69
Abb. 105: LSM-Aufsicht des PK 7 – 10. Tag	69
Abb. 106: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers TICER®	70
Abb. 107: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 3. Tag	70
Abb. 108: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 5. Tag	70
Abb. 109: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 7. Tag	70
Abb. 110: LSM-90°-Projektion des PK 7 (TICER®) – 10. Tag	70

Abb. 111: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^3] an den Versuchstagen im Stack	72
Abb. 112: BSP-Expression $\bar{x} \pm s$ [μm^2] an den Versuchstagen bei summierter Projektion	72
Abb. 113: LSM-Aufsicht des PK 8 – 3. Tag	73
Abb. 114: LSM-Aufsicht des PK 8 – 5. Tag	73
Abb. 115: LSM-Aufsicht des PK 8 – 7. Tag	73
Abb. 116: LSM-Aufsicht des PK 8 – 10. Tag	73
Abb. 117: \bar{x} [μm] der vertikalen Dimension an Versuchstagen des Probekörpers CPT	74
Abb. 118: LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 3. Tag.....	74
Abb. 119 LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 5. Tag.....	74
Abb. 120: LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 7. Tag.....	74
Abb. 121: LSM-90°-Projektion des PK 8 (CPT) – 10. Tag.....	74
Abb. 122: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 1 – ZSE	75
Abb. 123: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 2 – ZSG	75
Abb. 124: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 3 – ZSG $\frac{1}{2}$	75
Abb. 125: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 4 – ZS4-0,5.....	75
Abb. 126: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 5 – ZS4-2.....	76
Abb. 127: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 6 – Cercon®	76
Abb. 128: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 7 – TICER®	76
Abb. 129: 90°-Projektion des Leerprobekörpers 8 – CPT	76
Abb. 130: grafische Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^3 bei verschiedenen Probekörpern und Versuchstagen	77
Abb. 131: grafische Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^2 bei verschiedenen Probekörpern und Versuchstagen	78
Abb. 132: grafische Darstellung der Mittelwerte der vertikalen Dimension der Stacks bei verschiedenen Probekörpern und Versuchstagen.....	78
Abb. 133: Zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^3 bei verschiedenen Versuchstagen im Stack.....	85
Abb. 134: Zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der BSP-Expression in μm^2 bei verschiedenen Versuchstagen bei summierender Projektion.....	85

Literaturverzeichnis

1. Abou-Samra, A. B., G. R. Mundy und T. J. Martin (1993). Physiology and pharmacology of bone. 107. Berlin, Springer-Verlag. 9780387562933
 2. Adell, R., B. Eriksson, U. Lekholm, P. I. Branemark und T. Jemt (1990). "Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws." *Int J Oral Maxillofac Implants* 5(4): 347-359.
 3. Al-Nawas, B., K. A. Grotz, H. Goetz, M. Feil, H. Duschner und W. Wagner (2006). "Systematic qualitative histology of enossal implants with anodically oxidised surfaces." *Mund Kiefer Gesichtschir* 10(4): 229-237.
 4. Albrektsson, T., C. Johansson, A. Lundgren, Y. Sul und J. Gottlow (2000). "Experimental studies on oxidized implants. A histomorphical and biomechanical analysis." *Appl Osseointegration* 1: 21-24.
 5. alkomdigital-S.à.r.l (2002), zuletzt aufgerufen am: 18.07.2011. "alkomdigital." from <http://www.alkom-digital.com/produkte/zirkon.html>.
 6. Anderson, H. C., P. R. Reynolds, H. H. T. Hsu, L. Missana, K. Masuhara, P. E. Moylan und H. I. Roach (2002). "Selective synthesis of bone morphogenetic proteins-1, -3, -4 and bone sialoprotein may be important for osteoinduction by Saos-2 cells." *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 20(2): 73-82.
 7. Arai, N., K. Ohya, S. Kasugai, H. Shimokawa, S. Ohida, H. Ogura und T. Amagasa (1995). "Expression of bone sialoprotein mRNA during bone formation and resorption induced by colchicine in rat tibial bone marrow cavity." *J Bone Miner Res* 10(8): 1209-1217.
 8. Bianco, P., L. W. Fisher, M. F. Young, J. D. Termine und P. G. Robey (1991). "Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues." *Calcif Tissue Int* 49(6): 421-426.
 9. Bianco, P., M. Riminucci, E. Bonucci, J. D. Termine und P. G. Robey (1993). "Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition." *J Histochem Cytochem* 41(2): 183-191.
 10. Bosshardt, D. D., S. Zalzal, M. D. McKee und A. Nanci (1998). "Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum." *Anat Rec* 250(1): 13-33.
-

11. Brånemark, P.-I. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw : experience from a 10-year period. Stockholm, Almqvist & Wiksell international. 912200128X ; 9789122001287
 12. Brånemark, P.-I., R. Adell, U. Breine, B. O. Hansson, J. Lindstrom und A. Ohlsson (1969). "Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies." Scand J Plast Reconstr Surg 3(2): 81-100.
 13. Brevier (2003). Brevier Technische Keramik. 4. Auflage. Lauf a.d. Pegnitz, Hrsg: Verband der Keramischen Industrie e.V.; Fahner Verlag. ISBN 3-924158-77-0
 14. Buser, D., T. Nydegger, H. P. Hirt, D. L. Cochran und L. P. Nolte (1998). "Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs." Int J Oral Maxillofac Implants 13(5): 611-619.
 15. Butler, W. T. (1989). "The nature and significance of osteopontin." Connect Tissue Res 23(2-3): 123-136.
 16. Chen, J., T. B. Aufdemorte, H. Jiang, A. R. Liu, W. Zhang und H. F. Thomas (1998). "Neoplastic odontogenic epithelial cells express bone sialoprotein." Histochem J 30(1): 1-6.
 17. Chen, J., H. S. Shapiro und J. Sodek (1992). "Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues." J Bone Miner Res 7(8): 987-997.
 18. Chevalier, J. (2006). "What future for zirconia as a biomaterial?" Biomaterials 27(4): 535-543.
 19. Cook, S. D., K. A. Walsh und R. J. Haddad, Jr. (1985). "Interface mechanics and bone growth into porous Co-Cr-Mo alloy implants." Clin Orthop Relat Res(193): 271-280.
 20. Cowles, E. A., M. E. DeRome, G. Pastizzo, L. L. Brailey und G. A. Gronowicz (1998). "Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development." Calcif Tissue Int 62(1): 74-82.
 21. Davies, J. E. (1998). "Mechanisms of endosseous integration." Int J Prosthodont 11(5): 391-401.
 22. Dubrulle, J. H., E. Viguier, G. Le Naour, M. T. Dubrulle, M. Auriol und Y. Le Charpentier (1999). "Evaluation of combinations of titanium, zirconia, and alumina implants with 2 bone fillers in the dog." Int J Oral Maxillofac Implants 14(2): 271-277.
-

23. Ferraris, M., E. Verne, P. Appendino, C. Moisesescu, A. Krajewski, A. Ravaglioli und A. Piancastelli (2000). "Coatings on zirconia for medical applications." *Biomaterials* 21(8): 765-773.
 24. Fisher, L. W., G. R. Hawkins, N. Tuross und J. D. Termine (1987). "Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone." *J Biol Chem* 262(20): 9702-9708.
 25. Fisher, L. W., O. W. McBride, J. D. Termine und M. F. Young (1990). "Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization." *J Biol Chem* 265(4): 2347-2351.
 26. Fisher, L. W., S. W. Whitson, L. V. Avioli und J. D. Termine (1983). "Matrix sialoprotein of developing bone." *J Biol Chem* 258(20): 12723-12727.
 27. Gahlert, M., T. Gudehus, S. Eichhorn, E. Steinhauser, H. Kniha und W. Erhardt (2007). "Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs." *Clin Oral Implants Res* 18(5): 662-668.
 28. Ganss, B., R. H. Kim und J. Sodek (1999). "Bone sialoprotein." *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1): 79-98.
 29. Garvie, R. C., R. H. Hannink und R. T. Pascoe (1975). "Ceramic steel?" *Nature* 258(5537): 703-704.
 30. Gehrke, P. (2008). "Zirkonoxid in der Zahnheilkunde." *die dental praxis, Praxis & Wissenschaft XXV, Heft 1/2*: 21-28.
 31. Glauser, R., A. Lundgren, J. Gottlow, L. Sennerby, M. Portmann, P. Ruhstaller und C. H. F. Hämmerle (2003). "Immediate Occlusal Loading of Brånemark TiUnite™ Implants Placed Predominantly in Soft Bone: 1-Year Results of a Prospective Clinical Study." *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 5: 47-56.
 32. Glauser, R., M. Portmann, P. Ruhstaller, A. Lundgren, C. Hämmerle und J. Gottlow (2001). "Stability measurements of immediately loaded machined and oxidized implants in the posterior maxilla: a comparative clinical study using resonance frequency analysis." *Appl Osseointegration Res* 2: 27-29.
 33. Gottlow, J., C. Johansson, T. Albrektsson und A. Lundgren (2000). "Biomechanical and histologic evaluation of the TiUnite and Osseotite implant surfaces in rabbits after 6 weeks of healing." *Appl Osseointegration* 1: 25-27.
 34. Graf, H.-L. (1997). *Zur Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Implantatsystems*. Leipzig, s.n.
-

35. Graf, H.-L., B. Geu, W. Knöfler und A. Hemprich (2001). "Prospektive klinische Studie zur Beschreibung des klinischen Verhaltens des ZL-Duraplast-Implantatsystems mit TICER- Oberfläche. 1.Mitteilung: Überlebensraten." Zahnärztliche Implantologie 17: 124-131.
 36. Graf, H.-L., J. Hofmann, U. Tröger, J. Schreckenbach und H. Hilbig (2009). "In vitro studies to screen for implant surface properties." Journal of Dental Implantology 3: 250-262.
 37. Graf, H.-L. und W. Knöfler (1986). "Indikation und Anwendung unbeschichteter und beschichteter MLW Titanimplantate des Typs Leipzig." Sektion Stomatologie der Karl-Marx-Universität Leipzig: 22-56.
 38. Graf, H.-L., W. Knöfler und A. Hemprich (2004). "Entwicklung der Technologie der „Anodischen Oxidation unter Funkenentladung (ANOF)“ zur Konditionierung von Implantatoberflächen." Implantologie 12 / 3: 257 - 269.
 39. Graf, H.-L., S. Stoeva, F. P. Armbruster, J. Neuhaus und H. Hilbig (2008). "Effect of bone sialoprotein and collagen coating on cell attachment to TICER and pure titanium implant surfaces." Int J Oral Maxillofac Surg 37(7): 634-640.
 40. Groll, J., J. Fiedler, E. Engelhard, T. Ameringer, S. Tugulu, H. A. Klok, R. E. Brenner und M. Moeller (2005). "A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion." J Biomed Mater Res A 74(4): 607-617.
 41. Hall, J. und J. Lausmaa (2000). "Properties of a new porous oxide surface on titanium implants." Appl Osseointegrat Res 1: 5-6.
 42. Heinegard, D. und A. Oldberg (1989). "Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules." FASEB J 3(9): 2042-2051.
 43. Henning, D. (2011). "Zum Verhalten von zirkonoxidhaltigen Konversionsoberflächen nach dem ANOF-Verfahren auf Titan-Grundkörpern in der humanen Knochenzellkultur." Dissertation Leipzig.
 44. Heydecke, G., R. Kohal und R. Glaser (1999). "Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report." Int J Prosthodont 12(2): 184-189.
 45. Hilbig, H., M. Kirsten, R. Rupietta, H. L. Graf, S. Thalhammer, S. Strasser und F. P. Armbruster (2007). "Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxillar bone." Eur J Med Res 12(1): 6-12.
-

46. Hoffmann, O., N. Angelov, F. Gallez, R. E. Jung und F. E. Weber (2008). "The zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits." *Int J Oral Maxillofac Implants* 23(4): 691-695.
 47. Hultenby, K., F. P. Reinholt, M. Norgard, A. Oldberg, M. Wendel und D. Heinegard (1994). "Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin." *Eur J Cell Biol* 63(2): 230-239.
 48. Hunter, G. K. und H. A. Goldberg (1993). "Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8562-8565.
 49. Ichikawa, Y., Y. Akagawa, H. Nikai und H. Tsuru (1992). "Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo." *J Prosthet Dent* 68(2): 322-326.
 50. Ingram, R. T., B. L. Clarke, L. W. Fisher und L. A. Fitzpatrick (1993). "Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity." *J Bone Miner Res* 8(9): 1019-1029.
 51. Kerr, J. M., L. W. Fisher, J. D. Termine, M. G. Wang, O. W. McBride und M. F. Young (1993). "The human bone sialoprotein gene (IBSP): genomic localization and characterization." *Genomics* 17(2): 408-415.
 52. Kim, R. H., H. S. Shapiro, J. J. Li, J. L. Wrana und J. Sodek (1994). "Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene and its promoter sequence." *Matrix Biol* 14(1): 31-40.
 53. Kinne, R. W. und L. W. Fisher (1987). "Keratan sulfate proteoglycan in rabbit compact bone is bone sialoprotein II." *J Biol Chem* 262(21): 10206-10211.
 54. Koeck, B. und W. Wagner (1996). *Implantologie*. 1. Auflage. München - Wien - Baltimore, Urban & Schwarzenberg. 9783541153510
 55. Krysmann, W. (1982). *Beitrag zur anodischen Oxydation von Aluminium unter Funkenentladung*. Karl-Marx-Stadt, Techn. Hochschule, Fak. f. Mathematik u. Naturwiss.
 56. Kurze, P., W. Krysmann, G. Marx, W. Knöfler, H. Graf und H. Hampel (1984). *Beschichtetes Implantat*. Patentschrift WP A61F/2439385. DD 210 607.
 57. Liebich, H. (2009). *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* Histologie online: die Bilddatenbank mit dem Plus. Schattauer. 9783794526925
-

-
58. Mansson, B., D. Carey, M. Alini, M. Ionescu, L. C. Rosenberg, A. R. Poole, D. Heinegard und T. Saxne (1995). "Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism." *J Clin Invest* 95(3): 1071-1077.
59. Marx, R. (1993). Moderne keramische Werkstoffe für ästhetische Restaurationen – Verstärkung und Bruchzähigkeit. *Dtsch Zahnärztl Z* 48: 229-236.
60. Marx, R. E. (1994). "Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction." *Clin Plast Surg* 21(3): 377-392.
61. Marx, R. E., E. R. Carlson, R. M. Eichstaedt, S. R. Schimmele, J. E. Strauss und K. R. Georgeff (1998). "Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85(6): 638-646.
62. Meredith, N. (1998). "Assessment of implant stability as a prognostic determinant." *Int J Prosthodont* 11(5): 491-501.
63. Meyer, H. (2002). "Vollkeramischer Zahnersatz auf der Basis von gefrästen Zirkonoxid." *ZMK* 18: 434 - 435.
64. Misch, C. E. (1990). "Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive bone loading." *Int J Oral Implantol* 6(2): 23-31.
65. Mustafa, K., J. Wroblewski, K. Hultenby, B. Silva Lopez und K. Arvidson (2000). "Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone." *Clinical Oral Implants Research* 11(2): 116-128.
66. Neupert, G. und W. Knöfler (1986). "The cytotoxicity of various metals with oxide layers in vitro. 2: Behavior of cells directly on the oxide layers." *Stomatol DDR* 36(1): 33-36.
67. Oldberg, A., A. Franzen und D. Heinegard (1988). "The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein." *J Biol Chem* 263(36): 19430-19432.
68. Payer, M. (2010). "Cell growth on different zirconia and titanium surface textures: a morphologic in vitro study. Zellwachstum auf unterschiedlich strukturierten Zirkoniumdioxid- und Titan-Oberflächen: eine morphologische In-vitro-Untersuchung." *Zeitschrift für zahnärztliche Implantologie* 26(4): 338.
-

-
69. Piconi, C., W. Burger, H. G. Richter, A. Cittadini, G. Maccauro, V. Covacci, N. Bruzzese, G. A. Ricci und E. Marmo (1998). "Y-TZP ceramics for artificial joint replacements." *Biomaterials* 19(16): 1489-1494.
70. Piconi, C. und G. Maccauro (1999). "Zirconia as a ceramic biomaterial." *Biomaterials* 20(1): 1-25.
71. Quirynen, M., C. M. Bollen, W. Papaioannou, J. Van Eldere und D. van Steenberghe (1996). "The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations." *Int J Oral Maxillofac Implants* 11(2): 169-178.
72. Rezwan, K., A. R. Studart, J. Voros und L. J. Gauckler (2005). "Change of zeta potential of biocompatible colloidal oxide particles upon adsorption of bovine serum albumin and lysozyme." *J Phys Chem B* 109(30): 14469-14474.
73. Rimondini, L., L. Cerroni, A. Carrassi und P. Torricelli (2002). "Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study." *Int J Oral Maxillofac Implants* 17(6): 793-798.
74. Roach, H. I. (1994). "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption." *Cell Biol Int* 18(6): 617-628.
75. Ross, F. P., J. Chappel, J. I. Alvarez, D. Sander, W. T. Butler, M. C. Farach-Carson, K. A. Mintz, P. G. Robey, S. L. Teitelbaum und D. A. Cheresch (1993). "Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption." *J Biol Chem* 268(13): 9901-9907.
76. Ruf, T. (2001). Bone Sialoprotein (BSP) ein neuer Knochenstoffwechselfaktor : Wertigkeit unter Berücksichtigung der etablierten Knochenumsatzparameter. Gissen, Universitätsbibliothek.
77. Rupietta, R. (2007). Versuche zur organischen Beschichtung von Implantatmaterial. Promotionsschrift Universität Leipzig.
78. Schreckenbach, J. P., G. Marx, F. Schlottig, M. Textor und N. D. Spencer (1999). "Characterization of anodic spark-converted titanium surfaces for biomedical applications." *J Mater Sci Mater Med* 10(8): 453-457.
79. Schupbach, P. und R. Glauser (2007). "The defense architecture of the human periimplant mucosa: a histological study." *J Prosthet Dent* 97(6 Suppl): S15-25.
-

80. Schwartz, Z., C. H. Lohmann, J. Oefinger, L. F. Bonewald, D. D. Dean und B. D. Boyan (1999). "Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage." *Adv Dent Res* 13: 38-48.
 81. Somerman, M. J., J. J. Sauk, R. A. Foster, K. Norris, K. Dickerson und W. S. Argraves (1991). "Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum." *J Periodontal Res* 26(1): 10-16.
 82. Sommer, B., M. Bickel, W. Hofstetter und A. Wetterwald (1996). "Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues." *Bone* 19(4): 371-380.
 83. Stevens, R. (1986). *Zirconia and Zirconia Ceramics*. . Magnesium Electron Publication No. 113 Litho 2000. Twickenham.
 84. Stock, M. und P. Gehrke (2003). "Grundlegende Mechanismen der knöchernen Integration am Material-Biosystem-Interface." *Wissenschaftliches Bulletin Dentsply Friadent*:1-8.
 85. Tan, P. L. und J. T. Dunne, Jr. (2004). "An esthetic comparison of a metal ceramic crown and cast metal abutment with an all-ceramic crown and zirconia abutment: a clinical report." *J Prosthet Dent* 91(3): 215-218.
 86. Uccello, M., G. Malaguarnera, M. Vacante und M. Motta (2011). "Serum bone sialoprotein levels and bone metastases." *J Cancer Res Ther* 7(2): 115-119.
 87. Wang, M. L., R. Tuli, P. A. Manner, P. F. Sharkey, D. J. Hall und R. S. Tuan (2003). "Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles." *J Orthop Res* 21(4): 697-707.
 88. Watzak, G., W. Zechner, D. Busenlechner, C. Arnhart, R. Gruber und G. Watzek (2006). "Radiological and clinical follow-up of machined- and anodized-surface implants after mean functional loading for 33 months." *Clin Oral Implants Res* 17(6): 651-657.
 89. Wiener, T. (2003). "BSP-Antikörper: Optimierung der Anwendung in vitro und im Schnitt." *Dissertation Leipzig*.
 90. Wintermantel, E. und S. W. Ha (1998). *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen: Implantate für Medizin und Umwelt*. 2.Auflage. Berlin, Springer Verlag. ISBN 9783540646563
 91. Wohlwend, A., S. Studer und P. Schärer (1996). "Das Zirkonoxidabutment - ein neues vollkeramisches Konzept zur ästhetischen Verbesserung der Suprastruktur in der Implantologie." *Quintessenz Zahntech* 22/4: 364 - 381.
-

-
92. Woodman, J., W. Shinn, R. Urban und J. Galante (1984). "Electron microprobe analysis of metal ion transport in cortical bone." *J Biomed Mater Res* 18(4): 463-466.
93. Worthington, P. und R. U. Rauch (1995). "Osseointegration in der Zahnmedizin: Eine Einführung." *Quintessenz*: 21-28.
94. Wuttke, M., S. Muller, D. P. Nitsche, M. Paulsson, F. G. Hanisch und P. Maurer (2001). "Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding." *J Biol Chem* 276(39): 36839-36848.
95. Xiropaidis, A. V., M. Qahash, W. H. Lim, R. H. Shanaman, M. D. Rohrer, U. M. Wikesjo und J. Hall (2005). "Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants." *Clin Oral Implants Res* 16(5): 532-539.
96. Yao, K. L., R. Todescan, Jr. und J. Sodek (1994). "Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture." *J Bone Miner Res* 9(2): 231-240.
97. Zeiss, C. (2002). *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen*. Jena: 45-0029 d/0009.0003.
98. Zhang, Q., C. Domenicucci, H. A. Goldberg, J. L. Wrana und J. Sodek (1990). "Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein. Demonstration that the 23-kDa glycoprotein is derived from the carboxyl terminus of SPPI." *J Biol Chem* 265(13): 7583-7589.
99. Zinger, O., G. Zhao, Z. Schwartz, J. Simpson, M. Wieland, D. Landolt und B. Boyan (2005). "Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features." *Biomaterials* 26(14): 1837-1847.
-

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Kristin Bachmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift
